

**MTA DOKTORA PÁLYÁZAT
DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

***IMMUNOLÓGIAI KUTATÁSOK
BŐRGYÓGYÁSZATI KÓRKÉPEKBEN***

SZEGEDI ANDREA

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BŐR- ÉS NEMIKÓRTANI KLINIKA
DEBRECEN, 2007**

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| Rövidítések jegyzéke | 4 |
| I. Kutatási előzmények | 6 |
| II. Bevezetés | 8 |
| II.1. Atopiás dermatitis | 8 |
| II.1.1. Epidemiológiai és genetikai adatok | 8 |
| II.1.2. A bőr barrier funkciójának károsodása atopiás dermatitisben | 9 |
| II.1.3. Az immunrendszer szerepe atopiás dermatitisben | 10 |
| II.1.4. A bakteriális fertőzés és a Toll szerű receptorok szerepe atopiás dermatitisben | 16 |
| II.1.5. Extrinzik és intrinzik atopiás dermatitis | 17 |
| II.2. Psoriasis vulgaris és psoriasisos arthropathia | 18 |
| II.2.1. Epidemiológiai és genetikai adatok | 18 |
| II.2.2. Citokin vizsgálatok psoriasis vulgarisban | 18 |
| II.2.3. A psoriasisos arthropathia patogenezise | 19 |
| II.2.4. Az aktív D ₃ vitamin immunológiai hatásai | 21 |
| II.2.5. Autoimmun betegségek és az aktív D ₃ vitamin kapcsolata | 23 |
| II.2.6. A psoriasis és az aktív D ₃ vitamin kapcsolata | 24 |
| II.3. Krónikus urticaria | 24 |
| II.3.1. Epidemiológia | 24 |
| II.3.2. A krónikus urticaria etiopatogenezise | 25 |
| II.3.3. Autoimmun urticaria | 28 |
| II.3.4. Citokinek szerepe krónikus urticariában | 30 |
| II.3.5. A krónikus urticaria kivizsgálása | 31 |
| II.3.6. Az autoimmun urticaria diagnosztikája | 31 |
| II.4. Az adhéziós molekulák | 33 |
| II.4.1. Adhéziós molekulák a bőrben | 33 |
| II.4.2. Az adhéziós molekulák bőrgyógyászati vonatkozásai – Pemphigus betegcsoport | 34 |
| II.4.3. A protein kináz C izoenzimek | 36 |
| II.4.4. A PKC izoenzimek és az adhéziós molekulák kapcsolata | 38 |
| II.5. Polisziisztémás autoimmun kórképek | 38 |
| II.5.1. A szisztémás lupus erythematosus epidemiológiája és patogenezise | 38 |
| II.5.2. A szisztémás lupus erythematosus klinikuma | 39 |
| II.5.3. Autoantitestek szisztémás lupus erythematosusban | 40 |
| II.5.4. Az anti-Ro/SS-A és anti-La/SS-B autoantitestek | 40 |
| II.5.5. A szisztémás lupus erythematosus kezelése | 41 |
| II.5.6. A polymyositis és a dermatomyositis patogenezise | 43 |
| II.5.7. Citokin vizsgálatok polymyositisben és dermatomyositisben | 44 |
| III. Célkitűzések | 46 |
| III.1. Atopiás dermatitis | 46 |
| III.2. Psoriasis vulgaris és psoriasisos arthropathia | 46 |
| III.3. Krónikus urticaria | 47 |
| III.4. Adhéziós molekulák – Pemphigus | 47 |
| III.5. Polisziisztémás autoimmun kórképek | 48 |
| IV. Betegek és módszerek | 49 |
| IV.1. Betegek | 49 |
| IV.1.1. Atopiás dermatitis | 49 |
| IV.1.2. Psoriasis vulgaris és psoriasisos arthropathia | 49 |
| IV.1.3. Krónikus urticaria | 50 |
| IV.1.4. Polisziisztémás autoimmun kórképek | 51 |
| IV.2. Módszerek – Klinikai protokollok | 53 |
| IV.2.1. Alphacalcidol kezelés hatásának vizsgálata során alkalmazott protokoll | 53 |
| IV.2.2. Alphacalcidol kezelés hatásának klinikai és laboratóriumi értékelése | 53 |
| IV.2.3. UVA1 terápia klinikai protokollja | 54 |
| IV.2.4. UVA1 terápia hatékonyságának klinikai értékelése | 55 |
| IV.2.5. UVA1 terápia hatékonyságának laboratóriumi értékelése | 55 |
| IV.2.6. Kérdőív és urticaria score felállítása | 56 |
| IV.2.7. Krónikus urticaria kezelésénél alkalmazott terápiás protokoll | 56 |
| IV.2.8. Az autológ szérumbőrteszt | 57 |
| IV.3. Módszerek – Laboratóriumi technikák | 57 |
| IV.3.1. Limfocita és monocita szubpopulációk, valamint aktivált T sejtek arányának meghatározása | 57 |

| | |
|---|------------|
| IV.3.2. Intracitoplazmatikus citokinek meghatározása..... | 58 |
| IV.3.4. Sejtfelszíni CD14, TLR2, TLR4 és CD180 expresszió vizsgálata | 59 |
| IV.3.5. CD14 függő LPS kötés meghatározása | 59 |
| IV.3.6. CD14 függő E. coli fagocitózis vizsgálata | 60 |
| IV.3.7. Donor sejtek a BAT és HR teszt vizsgálatokhoz..... | 60 |
| IV.3.8. A donor sejtek szeparálása és stimulálása | 60 |
| IV.3.9. A bazofil aktivációs teszt – BAT..... | 61 |
| IV.3.10. A bazofil hisztamin felszabadulás mérése ELISA módszerrel (HR) | 62 |
| IV.3.11. Szolubilis citokin koncentrációk meghatározása szérumban | 63 |
| IV.3.12. Szolubilis CD14 mérése szérumban | 63 |
| IV.3.13. IgE szint meghatározása | 63 |
| IV.3.14. ECP szint mérése..... | 63 |
| IV.3.15. Autoantitestek meghatározása | 63 |
| IV.3.16. Immunhisztokémiai vizsgálat | 63 |
| IV.3.17. Sejtenyésztés | 64 |
| IV.3.18. HaCaT sejtek UVB besugárzása..... | 65 |
| IV.3.19. HaCaT sejtek ösztadiol kezelése..... | 65 |
| IV.3.20. Western (immuno)blot | 65 |
| IV.3.21. RNS izolálás és cDNS átírás | 66 |
| IV.3.22. Polimeráz láncreakció | 66 |
| IV.3.23. Kvantitatív real-time PCR (Q-PCR)..... | 67 |
| IV.3.24. RNS interferencia (RNSi)..... | 67 |
| IV.3.25. Statisztikai analízis | 68 |
| V. Eredmények és megbeszélés | 69 |
| <i>V.1. Atopiás dermatitis</i> | <i>69</i> |
| V.1.1. Eredmények | 69 |
| V.1.2. Megbeszélés..... | 74 |
| <i>V.2. Psoriasis vulgaris és psoriasis arthropathia</i> | <i>78</i> |
| V.2.1. Eredmények | 78 |
| V.2.2. Megbeszélés..... | 83 |
| <i>V.3. Krónikus urticaria.....</i> | <i>87</i> |
| V.3.1. Eredmények | 87 |
| V.3.2. Megbeszélés..... | 98 |
| <i>V. 4. Adhéziós molekulák – Pemphigus</i> | <i>106</i> |
| V.4.1. Eredmények | 106 |
| V.4.2. Megbeszélés..... | 112 |
| <i>V.5. Szisztémás autoimmun kórképek</i> | <i>116</i> |
| V.5.1. Eredmények | 116 |
| V.5.2. Megbeszélés..... | 123 |
| VI. Eredeti tudományos felismerések..... | 130 |
| VII. Az eredmények hasznosíthatósága | 132 |
| VIII. Köszönetnyilvánítások..... | 134 |
| IX. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke..... | 136 |
| X. Irodalomjegyzék..... | 139 |

Rövidítések jegyzéke

AD - atopiás dermatitis

a-ENA - extrahálható nukleáris antigén ellenes antitest

AIU - autoimmun urticaria

ANA - antinukleáris antitest

APS - antigén prezentáló sejt

ASST - autológ szérum bőrteszt – autologous serum skin test

a-TG - thyreoglobulin elleni antitest

a-TPO -thyreoidea peroxidáz ellenes antitest

BAT - bazofil aktivációs teszt

C - kolinerg urticaria

CLA - cutaneous lymphocyte-associated antigen,

D - szimptómás dermografizmus, urticaria factitia

D_A - atopiás donor

DM - dermatomyositis

D_{NA} - nem atopiás donor

dsc - desmocollin

dsg- desmoglein

EAD - extrinzik atopiás dermatitis

ECP - eozinofil kationos protein

FcεRIα – nagy affinitású Fc epsilon receptor α lánc

FU - fizikális urticaria

GM-CSF - granulocita makrofág kolónia stimuláló faktor

Hp - Helicobacter pylori

HR - hisztamin felszabadulás – histamine release

IAD - intrinzik atopiás dermatitis

IBD - gyulladásos bélbetegség – inflammatory bowel disease

IBM - inclusion body myositis

IDDM - inzulin dependens diabetes mellitus

IDEC - inflammatory dendritic epidermal cells

IFN-γ - interferon-γ

IL - interleukin

IMID- immune mediated inflammatory disease - immun mediált gyulladásos kórkép

KIU - krónikus idiopátiás urticaria
LPS - lipopoliszacharid
MCP1 - monocyte chemotactic protein 1
MDC - macrophage-derived chemokine
NLE - neonatális lupus erythematosus
PA- psoriasisos arthropathia
PAMP - pathogen associated molecular pattern
PASI - psoriasis area severity index
P-cad - P-cadherin
PDGF - platelet derived growth factor
PKC - protein kináz C
PM - polymyositis
PRR - pattern recognition receptor – mintázat felismerő receptor
pSS - primer Sjögren szindróma
RA - rheumatoid arthritis
SCID - súlyos kombinált immundeficiencia
SCLE - subcut cutan lupus erythematosus
SLE - szisztémás lupus erythematosus
SM - sclerosis multiplex
TGF- β - transforming growth factor β – transzformáló növekedési faktor- β
TLR – Toll-szerű receptor
TNF- β - tumor nekrosis faktor- β
UV - ultraibolya
VEGF - vascular endothelial growth factor

I. Kutatási előzmények

A tudományos kutatói munkával egyetemi éveim alatt kezdtem ismerkedni, amikor a Debreceni Orvostudományi Egyetem Központi Klinikai Kémiai Laboratóriumában (mai nevén Debreceni Egyetem OEC, Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézet) dolgoztam tudományos diákköri tagként, itt születtek meg első közleményeim is. Az egyetem befejezése után bőrgyógyászként kezdtem dolgozni, mely szakterület a színes és érdekes klinikai munka mellett a kutatómunka végzésére is kiváló lehetőséget nyújt, számos szakmával ad kollaborációs lehetőséget és mutat kapcsolódási pontot (immunológia, infektológia, daganatkutatás, genetika, sebgyógyulás, patológia stb.).

A bőrgyógyászaton belül érdeklődésem hamarosan az allergológia és immunológia felé fordult, részben családi indíttatás, részben az egyetemünkön kialakult jelentős immunológiai hagyományok révén. Mai tudásunk szerint a bőr nem csupán barrier funkciót lát el, hanem aktív immunszervként is működik, melynek legfontosabb sejtjes elemei a professzionális antigén prezentáló sejtek, az endothel sejtek, a bőrbe jutó T limfociták és a keratinociták. Utóbbiak immunfolyamatokban betöltött szerepének megismerése eredményezte a bőr immunrendszer (skin immune system, SIS) fogalmának bevezetését. Külföldi hosszabb tanulmányutamon is sikerült a bőrgyógyászat és az immunológia területén dolgoznom, szisztémás sclerosisban szenvedő betegek Fc γ receptor ellenes antitestjeit vizsgáltam, ezekről az eredményekről számoltam be Ph.D. értekezésemben. Később a Bőr- és Nemikórtani Klinikán az Allergológiai-autoimmun, majd a Psoriasis Szakrendelések munkájába és kutatásaiba kapcsolódtam be. A bőrgyógyászati betegek között nagy számban vannak az atopiás, autoimmun és az úgynevezett „immun mediált gyulladásos kórképben” (IMID- immune mediated inflammatory disease) szenvedők. A fenti szakrendeléseken dolgozva, majd ezek vezetőjeként több száz beteg gondozásával lehetőségem nyílt arra, hogy célzott kérdésekre irányított kutatásokat végezzek. Nagy segítséget jelentett számomra a klinikai betegellátás, a konzíliumok és a kutatás területén is kialakult jó kapcsolatom a III. sz. Belgyógyászati Klinikával, a Regionális Immunológiai Laboratóriummal, a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézettel és az Élettani Intézettel.

A bőrgyógyászati allergológiai és immunológiai kutatásaim területén választhattam azt a kutatási módszert, hogy egy betegségre, egy betegcsoportra koncentrálna epidemiológiai, klinikai, laboratóriumi vonatkozású teljes keresztmetszeti kutatásokat végzek, illetve választhattam azt a módszert, hogy több betegcsoportban azonos kutatási problémák

megoldására törekszem. Én az utóbbit választottam és atopiás, autoimmun (szervspecifikus és poliszisztémás) és immun mediált gyulladásos kórképekben végeztem hasonló kutatásokat. A kutatási céljaimat elsősorban az immunológia fejlődési irányai szabták meg. Az immunológiai kutatások fókuszában álló kérdéskörök közül kiemelten foglalkoztam az adaptív immunválasz működésével, elsősorban a T limfociták citokin termelésével (atopiás dermatitis, autoimmun urticaria, psoriasis, szisztémás lupus erythematosus, polymyositis, dermatomyositis), a regulatív funkciójú T sejtek közül az IL-10 termelő Tr1 sejtekkel (atopiás dermatitis, autoimmun urticaria, psoriasis, szisztémás lupus erythematosus, polymyositis, dermatomyositis), a szerzett immunválasz elemei közül a Toll szerű receptorok számával és funkciójával (atopiás dermatitis) és bizonyos patogenetikai kérdések tisztázásával az adhéziós molekulák területén (pemphigus). Ugyancsak gyorsan fejlődő területei az immunológiának a terápiás és diagnosztikai kutatások, ezek területén is igyekeztem előrelépéseket tenni (szisztémás lupus erythematosus, psoriasisos arthropathia, autoimmun urticaria). Az értekezésben összegzett munka a Ph.D. védés óta eltelt 10 év kutatásait foglalja egységbe.

II. Bevezetés

II.1. Atopiás dermatitis

II.1.1. Epidemiológiai és genetikai adatok

Az atopiás betegségekben szenvedők számának robbanásszerű növekedését ma már a „járványok” kialakulásához hasonlítják. Ezen kórképek egyike az atopiás dermatitis (AD) egy krónikus, hullámzó lefolyású, gyulladásos bőrbetegség, melynek legfőbb klinikai jellemzői az erős viszketés és a száraz bőr. Előfordulási gyakorisága a II. világháború óta egyes földrajzi területeken akár hússzoros növekedést is mutatott, jelenleg Európában a gyermekek 10-20%-a, hazánkban végzett felmérés szerint 17%-a szenved a betegség eltérő súlyosságú formái miatt (1-3). Az esetek 30%-ában későbbi életkorban asthma bronchiale, 60%-ban rhinitis allergica társul hozzá, s a három betegség együtt alkotja az atopiás betegségek csoportját. A csoporton belül az életkort tekintve elsőként rendszerint az AD jelenik meg, utalva a gyermek atopiás karakterére és előrevetítve a fokozott rizikót asthma bronchiale illetve rhinitis allergica megjelenésére (4).

Az AD multifaktoriális betegség, kialakulásában öröklött tényezők és számos környezeti faktor játszik szerepet. A környezeti tényezők közül, melyek hatására a meglévő genetikai hajlam talaján a betegség manifesztálódik, ki kell emelni az allergének (élelmiszerek, növényi pollenek, porok, atkák, állati szőrök), az irritáló tényezők (éghajlat, gyapjú ruházat, izzadás) és a fertőző ágensek (baktériumok, gombák, vírusok) szerepét.

A genetikailag meghatározott tényezők között ismertek a károsodott bőr barrier funkció, az immunrendszer működésében mutatkozó eltérések és a neurovegetatív idegrendszer zavara (5). Ez utóbbi szerepére utal AD-ben a kóros érreakciók következtében kialakuló fehér dermografizmus a betegek bőrén, a csökkent viszketési ingerküszöb illetve, hogy emocionális stressz gyakran vezet a bőrtünetek fellángolásához. Ikervizsgálatok bizonyították, hogy monoizigóta ikrekben a konkordancia 0,72 illetve 0,86, míg heteroizigóta ikrekben ez az érték 0,21 és 0,23-nak mutatkozott (6,7). Az egyik szülő betegsége esetén a gyermekek 60%-ánál, míg mindkét szülő betegsége esetén 80%-ánál alakul ki várhatóan AD (8). A betegség öröklésmenete poligénes, genetikai vizsgálatok számos allél szerepét mutatták ki, a legfontosabbakat az 1. táblázat mutatja be (9-17). Az egyik legszorosabb összefüggést az 5. kromoszóma hosszú karján a 31. lókuszt esetében figyelték meg. Több citokin gén található ezen a területen, többek között az IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 és GM-CSF termeléséért felelős gének, mely citokineket döntően a T helper 2 (Th2) sejtek termelik. AD-ben sikerült az IL-4

gén promotor régiójának olyan típusú polimorfizmusát kimutatni, mely fokozott aktivitást eredményez. A kostimulációs sejtfelszíni molekulák vizsgálata is egy fokozott Th2 típusú aktiváció lehetőségét mutatja. A Th2 típusú sejtek éréséhez a limfocita és az antigén prezentáló sejt közötti CD28 és B7.2. felszíni molekulák kostimulációs kapcsolata szükséges. AD-ben kimutatott, hogy a B sejtek szignifikánsan több sejtfelszíni B7.2.-t jelenítenek meg, mint az egészséges kontrollok B sejtjei és az érintett bőrben a Langerhans sejtek is dominálónan B7.2.-t expresszálnak a B7.1. molekulával szemben. (18,19). Az AD és az asthma bronchiale közötti szoros összefüggést nem csupán a gyakori társulás vagy a patomechanizmus számos közös vonása jelzi, hanem a patogenezisben fontos szerephez jutó gén szakaszokban megfigyelt azonosságok is.

| Kromoszóma hely | Vizsgált gén |
|------------------|---|
| 3q21 | A T-limfocita aktivációban szerepet játszó kostimuláló molekulák (CD80 és CD86) |
| 5q31-33 | Interleukin 4 |
| 11q13 | Az IgE nagy affinitású receptorának β alegysége (Fc ϵ RI β) |
| 13q12-14 | Nem azonosítható |
| 14q11.2 | Hízósejt kimáz |
| 1q21, 17q25, 20p | Dermális inflammatórikus gének (?) |

1. táblázat: Az AD kialakulásában szerepet játszó fontos lókuszok és általuk meghatározott gének.

II.1.2. A bőr barrier funkciójának károsodása atopiás dermatitisben

Régi megfigyelés, hogy az AD-ben szenvedők bőre száraz, érdes tapintatú a csökkent lipidtermelés, a károsodott vízkötő kapacitás, valamint a fokozott transzepidermális vízvesztés miatt. A lipidréteg eltérései közül kiemelendő a fokozott sphingomyelin deacylase aktivitás miatt csökkent ceramid szint (20). Az epidermális barrier kialakításában a lipidek mellett fontos fehérjék szerepének tanulmányozása az utóbbi években a tudományos érdeklődés előterébe került. Az egyik kiemelkedő értékű vizsgálat sorozat az epidermisben fontos szerephez jutó filaggrin mutációit emelte ki (21). A filaggrin a keratinociták terminális differenciálódása során a profilaggrin felhasításából származó polipeptid, mely a keratin citoszkeleton rendszert aggregálja és segíti egy, az epidermális barrier fenntartásában kulcsfontosságú sűrű protein-lipid matrix (cornified envelope) kialakulását a stratum corneumban (22-24). Ez a struktúra védi az epidermist a vízvesztéstől, valamint az allergének, irritáló anyagok és fertőző ágensek behatolásától. Az elmúlt években sikerült kimutatni, hogy az ichthyosis vulgaris kialakulásáért a filaggrin gén két, funkcióvesztéshez vezető mutációja

felelős (filaggrin locus-1q21, R501X, 2282del4) (25). Mivel az ichthyosis és az AD szoros kapcsolatára utal gyakori társulásuk, további vizsgálatokat végezve a kutatócsoport megállapította, hogy a filaggrin gén említett mutációi fontos predisponáló faktorok az AD és az AD-el társuló asthma kialakulásában is (21).

Comel-Netherton szindrómában, ahol gyakori az atopia jelenléte, a SPINK5 gén mutációja következtében egy szerin proteáz inhibitor (LEKTI) működésének károsodását mutatták ki, majd ezen polimorfizmusok egyikét megtalálták AD-ben is (26). A szerin proteáz inhibitor a bakteriális és endogén proteázok gátlásával fontos szerepet játszik a bőr barrier védelmében.

A barrier funkció fontosságára utal, hogy AD terápiájában a bőr hidratálását, a lipidtartalom pótlását célzó bázisterápia alapvető fontosságú. Ennek elmulasztása esetén az egyéb terápiás lépések hatástalanná válhatnak, illetve a bázisterápiát a recidíva megelőzése céljából tünetmentes bőrön is folytatni kell.

II.1.3. Az immunrendszer szerepe atopiás dermatitisben

T sejtek, citokinek

Citokin termelési mintázatuk alapján mind a helper (Th), mind a citotoxikus T (Tc) sejtek csoportokra oszthatók fel: Th1, Th2, Th3, Tc1, Tc2. A Th1 típusú limfociták elsősorban tumor nekrozis faktor- β -t (TNF- β), interferon- γ -t (IFN- γ) és interleukin-2-t (IL-2) termelnek (1-es típusú citokinek), kooperálnak a B sejtekkel az IgG1 és IgG3 típusú antitestek termelésében, aktiválják a fagocita sejteket és citotoxikus T sejteket, vagyis a celluláris immunválasz és a citotoxikus T sejt válasz beindításáért és fenntartásáért felelősek. A Th2 típusú limfociták karakterisztikus citokinjei közé soroljuk az IL-4-t, IL-5-t, IL-6-t és az IL-13-t (2-es típusú citokinek), melyek a B limfociták aktivációjában, az ellenanyag termelés regulációjában és az IgE termeléshez nélkülözhetetlen nehézlánc izotípus váltásban játszanak fontos szerepet, továbbá elősegítik a hízósejtek és az eozinofil granulociták proliferációját (27). A Th3 sejtek a regulatórikus T limfociták csoportjába tartoznak és elsősorban transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) termelés jellemzi őket (28).

Régóta ismert az a megfigyelés, hogy az AD-ben szenvedő gyerekeknél gyakran alakul ki két éves kor alatt elsősorban élelmiszerekkel, későbbi életkorban pedig légúti allergénekkal (háziporotka, lisztatka, növényi pollenek és állati szőrök) szembeni I. típusú, IgE termeléssel járó azonnali allergiás reakció, s ezen szenzibilizációnak az atopiás bőrgyulladás létrejöttében is szerepe van. Az allergénekkal szembeni I. típusú túlérzékenység

egyéb atopiás betegségek kialakulásához is vezethet (asthma bronchiale, allergiás rhinitis). Ezen kívül szintén gyakori laboratóriumi lelet az emelkedett eozinofil sejtszám, s a sejtek aktivitását jellemző magasabb szérumban eozinofil kationos protein (ECP) szint, eozinofil eredetű neurotoxin (EDN) és major basic protein (MBP) szint.

AD-ben a perifériás vérben Th2 dominanciát és csökkent Th1/Th2 arányt lehet kimutatni, mely magyarázatul szolgálhat a bejutó antigének hatására képződő IgE típusú antitestek megjelenésére és eozinofil aktivációra (29,30). AD-ben szenvedő betegek heparinnal alvadást okozó vérből szeparált mononukleáris sejtek stimulációját követően Katsunuma és mtsai leírták az IFN- γ csökkent termelődését, míg az IL-5 expresszióban nem tudtak szignifikáns eltérést kimutatni (31). Más vizsgálatok stimulált sejtek 24 órás felülcsúszóját tanulmányozva AD-ben csökkent mennyiségű IFN- γ -t, granulocita makrofág kolónia stimuláló faktort (GM-CSF), és emelkedett szintű IL-5-t és IL-13-t mutattak ki ELISA technikával (32). Ezt megerősítették azok az eredmények, melyek perifériás vér CD4⁺ T sejtjeiben csökkent expressziójú IFN- γ -t, és emelkedett expressziójú IL-4-t valamint IL-13-t detektáltak (33). Antunez és mtsai az akut és krónikus AD-s betegek vérében lévő CD4⁺ és CD8⁺ T sejtek IL-2, IL-13, IFN- γ , TNF- α , IL-10 és IL-4 expresszióját vizsgálták áramlási citometriás módszerrel. Akut AD-es betegekben az IL-4, IL-13 és TNF- α fokozott expresszióját írták le a kontroll egyének adataihoz képest, de nem találtak különbséget a két AD-s betegcsoport eredményei között (34). Ezek alapján a Th2 dominancia AD-ben egyértelmű, de az irodalmi adatok megoszlanak azzal kapcsolatban, hogy ez az arányeltolódás mely 2-es típusú citokin fokozott termelésének (IL-4 és/vagy IL-13) révén jön létre.

AD-ben a képződő antigén specifikus Th2 sejtek felszíni CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) expressziójuk révén nagy mennyiségben vándorolnak a bőrbe és indítják el az ekzémás gyulladást. AD-ben szenvedők bőrlézióiban is kimutatható a citokin termelés egyensúlyának felborulása, azonban más jellegű elváltozások észlelhetők az akut és a krónikus bőrtünetek területén. Az akut fázisban klinikailag erős hiperémia, nedvezés, szeropapula képződés és felületesebb beszűrtség jellemző, melyhez szövettanilag epidermális spongiózis és elsősorban aktivált T sejtekből álló perivaszkuláris infiltráció, hízósejt degranuláció társul. A krónikus ekzémás területen a bőr száraz, erősen lichenifikált, hámló, szürkés-livid színű. Szövettanilag hiperpláziás epidermis, hiperkeratózis, minimális spongiózis jellemző. A dermális sejtgyűletem monocita-makrofág sejtek és eozinofil granulociták uralják (35-39). Ez a dinamikus változás a klinikai és a szövettani képben más-más citokin milió kialakulásához vezet, illetve ennek következménye. Az AD-ben szenvedők

érintetlen bőrben fokozott számban mutathatók ki IL-4 és IL-13 mRNS-t expresszáló sejtek, míg nem mutatható ki az IL-5, IL-12 és IFN- γ termelés (40,41, 2. táblázat). Akut léziókban az IL-4 és IL-13 termelés mellett megjelenik a fokozott IL-5 termelés, de alacsony az IL-12 és IFN- γ termelő sejtek száma. A jelentős változást a krónikus léziók vizsgálata mutatja, miszerint szignifikánsan kevesebb az IL-4 és IL-13 mRNS-t termelő sejtek száma, ugyanakkor magasabb az IL-5, GM-CSF, IL-12 és IFN- γ termelő sejtek aránya. Az AD akut tünetei esetén tehát, elsősorban 2-es típusú, krónikus léziókban viszont 1-es típusú citokinek dominálják a lokális citokin környezetet a bőrben (5). Vizsgálatok megállapították, hogy a kezdeti 2-es típusú citokin termelés 1-es típusra történő váltásáért az IL-12 termelődése felelős, melyet eozinofil granulociták, monociták és dendritikus sejtek termelnek (42). A lokális IL-12 termelés fokozódása a Th1 sejtek éréséhez és citokin termelésük beindulásához vezet.

| Citokinek | Tünetmentes bőr | Akut gyulladás | Krónikus gyulladás |
|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| IL-4/IL-13 | + | ++++ | +++ |
| IL-5 | – | ++ | +++ |
| Interferon- γ | – | – | ++ |
| IL-12 | – | – | ++ |
| IL-16 | + | +++ | ++ |
| GM-CSF | – | + | ++ |

2. táblázat: AD-re jellemző citokin mintázat.

A Th1 és Th2 sejtípus együttes jelenléte AD-ben és egyéb atopiás kórképekben is, valamint az a tény, hogy az utóbbi években nem csupán az atopiás betegségek, de bizonyos autoimmun kórképek előfordulási gyakorisága is jelentősen emelkedett a populációban rámutat az un. „hygiene” hipotézis hiányosságaira. A „hygiene” hipotézis elsősorban a külső, környezeti tényezők megváltozásával, a fertőzések számának csökkenésével, az allergének számának növekedésével és következményesen fokozott Th2 és csökkent Th1 stimulációval magyarázza az atopiás kórképek gyakoriságának robbanásszerű emelkedését (43,44). Ma már több kutatócsoport megfogalmazta azt a véleményt, ami szerint a fentebb említett változások mellett, az allergiás és autoimmun kórképek együttesen megfigyelhető növekvő incidenciájának hátterében az immunválasz korai szakaszának és az immunregulációnak károsodása állhat (45-48). Ez a korábbi szakasz feltehetően az antigén prezentációt is magába foglaló veleszületett immunválaszban keresendő, amelyben az antigénprezentáló dendritikus sejtek játsszák a kulcsszerepet. Ugyancsak fontos szerepet játszhatnak a Th1/Th2 egyensúly

károsodásában az ún. regulatórikus T sejtek és az NKT sejtek, melyek citokin termelésük révén hatást tudnak gyakorolni a T sejtek érési folyamatára.

Dendritikus sejtek AD-ben

AD-ben, mint láttuk fokozott hajlam figyelhető meg az I-es típusú hiperszenzitivitási reakciók kialakulására, amely magas szérum össz IgE szinttel és gyakori allergén specifikus IgE termeléssel jár. Az ekzémás tünetek kialakulásáért azonban nem az I-es típusú reakció felelős elsősorban, hanem az allergén specifikus T limfociták bőrbe történő vándorlása és az általuk elindított IV. típusú gyulladásos folyamatok. Az I. és IV. reakciók között a kapcsolatot a bőrben elhelyezkedő dendritikus, antigén prezentáló sejtek (APS) képezik. A dendritikus sejtek a természetes immunválasz fontos szereplői, és hidat képeznek a természetes és az adaptív immunrendszer között. A dendritikus sejtek centrális szerepe többek között abból adódik, hogy nem csupán elindítani képesek az adaptív immunválaszt az antigén prezentáció révén, de jelentősen befolyásolják annak effektív szárát is. Felszíni kostimulációs molekuláik és az általuk termelt citokinek révén megszabják a kialakuló immunogén Th1/Th2 válasz minőségét vagy adott körülmények között a tolerancia biztosítását (49,50). Az antigén prezentáló sejtek felszínén számos patogén mintázat felismerő receptor (pattern recognition receptor, PRR) van (51-54). Az antigén természetétől függően más-más típusú PRR-hoz kötődik, eltérő adapter fehérjéken keresztül részben azonos, részben különböző szignál transzdukciós útvonalakat indít el, melynek eredménye különböző kostimulációs molekulák megjelenése és citokinek termelése lesz, ami pedig befolyásolja a Th1, Th2 irányú érést.

AD-ben a gyulladásos epidermisben két CD1a+, immunmorfológiailag és ultrastruktúráisan különböző dendritikus sejt jelenik meg. A klasszikus Langerhans sejtek: Birbeck granulum+, CD1a+++, HLADR+++, CD11b-, CD207+, CD80+, CD86+, CD40+ és az ún. „inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC): Birbeck granulum-, CD1a+, HLADR+++, CD11b+++, mannose receptor (CD206)+, CD80+, CD86+, CD40+ (55). Az eddigi kutatások alapján feltételezhetően a Langerhans sejtek elsősorban az AD kezdeti stádiumában fejtenek ki hatást, citokinek és kemokinek termelése révén fokozzák a naív T sejtek migrációját és az IDEC típusú sejtek érését az epidermisben, míg az IDEC típusú sejtek IL-12 termelésük révén a Th2-Th1 váltásban és a gyulladás krónikussá válásában játszanak szerepet (56).

Mindkét dendritikus sejtípus nagy számban hordoz a felszínén IgE kötő nagy affinitású Fcε receptort (FcεRI). AD-ben a szervezetbe a nyálkahártyákon vagy a bőrön át bejutó antigének hatására képződő IgE molekula kötődik a bőrben elhelyezkedő Langerhans

sejt FcεRI-hoz. A károsodott barrierű bőrön át ismételt bejutó antigént már a felszíni IgE molekulával felszerelt Langerhans sejt várja, a kötődés következtében a sejt aktiválódik és vagy a környező nyirokcsomóba vándorol, ahol antigén specifikus Th2 sejtek aktiválását idézi elő vagy lokálisan a bőrben prezentálja az antigént az antigén specifikus T sejteknek. A Langerhans sejtek ezzel egyidőben számos kemotaktikus hatású citokint termelnek, IL-16-ot, MDC-t (macrophage-derived chemokine) és MCP1-et (monocyte chemotactic protein 1), melyek hatására monociták és IDEC típusú sejtek előalakjai áramlanak a bőrbe, illetve indul meg fejlődésük (8). Az általuk beinduló IL-12 termelés pedig Th1 típusú sejtek képződéséhez és a folyamat krónikussá válásához vezet.

Az antigén prezentáló sejtek harmadik típusát, a plazmocitoid dendritikus sejteket nagyobb számban lehet megtalálni a perifériás vérben AD-ben, azonban csökkent számban lehet kimutatni az epidermisben, és bizonyos feltételezések szerint ennek szerepe lehet a betegeknél a bőrön gyakran megfigyelhető vírus fertőzések kialakulásában (57). Ugyanakkor Sary és mtsai immunhisztokémiai módszerrel AD-ben a dermisben emelkedett számban mutatták ki a CD123+BDCA-2+/CD45RA+/CD68+ plazmocitoid dendritikus sejtek jelenlétét (58).

Regulatórikus sejtek AD-ben

A regulatórikus T sejteknek ma már számos csoportját leírták, részletesen 3 fő típusát tanulmányozta eddig az irodalom (59). A tímuszban keletkező és a periférián elsősorban sejt-sejt kontaktus útján ható ún. „természetes” regulatórikus sejteket, a CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg sejteket, valamint a periférián képződő Th3 és Tr1 sejteket, melyek TGF-β és IL-10 termelés révén fejtik ki hatásukat. AD-ben kevés irodalmi adat ismert a regulatórikus T sejtek számát vagy funkcióját illetően. Ou és mtsai szerint AD-ben a perifériás vérben a CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg sejtek száma szignifikánsan megemelkedik, funkciójuk nem károsodik, de staphylococcus szuperantigének hatására csökken a sejtek immunszuppresszív képessége (60). A bőrben lejátszódó folyamatokat tekintve ugyancsak egy közlés ismert, miszerint a CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg sejtek száma csökken, míg a Tr1 sejtek száma inkább emelkedik AD-ben (61). Saját, még nem közölt és itt nem részletezett vizsgálataink szerint AD-ben a CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg sejtek száma mind a bőrben, mind a vérben szignifikánsan megemelkedik.

Az AD-ben zajló gyulladás egyéb sejtvesztői

AD-ben az eozinofil sejtek száma megszaporodik mind a vérben, mind a bőrben, s az általuk termelt citokinek és kemokinek fontos szerephez jutnak a lokális gyulladás kialakításában. Az eozinofil sejtek bőrbe vándorlásáért elsősorban a Th2 sejtek, hízósejtek és Langerhans sejtek által termelt IL-5, IL-3, GM-CSF és TNF- α felelős (62). A sejtekből felszabaduló ECP, melynek szintje összefüggést mutat a betegség aktivitásával, szerepet játszik a gyulladásos folyamat fenntartásában, az IL-12 pedig a Th2-Th1 váltásban. Az AD krónikussá válásában, a gyulladás elhúzódásában szerepe van az eozinofil granulociták és a monocita-makrofág sejtek átlagosnál hosszabb élettartamának, csökkent apoptotikus képességének. Ezt az IL-5 és a GM-CSF termelődése tartja fenn, mely utóbbit nem csupán a T limfociták, hanem az epidermális keratinociták is termelik.

A keratinociták ezen kívül is aktívan vesznek részt az AD-re jellemző lokális gyulladás kialakításában, IFN- γ és TNF- α stimuláció hatására szolubilis epidermális növekedési faktort (EGF) termelnek, amely fokozza az MCP1, az IP10, IL-8 és RANTES szekréciót, melyek következtében fokozódik az eozinofilok és monociták bevándorlása a bőrbe (63,64). AD-ben kimutatott, hogy a CLA⁺ Th2 sejtek nagy mennyiségben képesek IL-31 termelésre, mely keratinocita aktivációhoz és kemokin termeléshez vezet (65,66). A keratinociták ugyancsak szekretálnak TNF- α -t és IL-1 β -t, valamint képesek CCL5, CCL17 és CCL20 kemokinek termelésére, melyek hatására CLA⁺ memória T sejtek jelennek meg a bőrben. Mechanikus trauma, viszketés hatására is számos gyulladásos citokin termelése indul be a keratinocitákban, mely sejtek mint látható nem csupán célpontjai az AD-ben zajló gyulladásnak, de hozzájárulnak a gyulladás kialakulásához és fenntartásához is (67,68). Legújabb irodalmi adatok szerint AD-ben a Th2 választ kiváltó IL-33 ST2 receptor génjének olyan polimorfizmusát írták le, mely fokozott receptor expressziót eredményez keratinocitákon (69,70).

AD-ben jellemző, hogy a betegek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiben fokozott a ciklikus AMP-(cAMP) foszfodiesteráz enzim aktivitása, aminek következtében csökken az intracelluláris cAMP szint. A monocitákban ez fokozott prosztaglandin E2 (PGE2) és IL-10 termeléshez vezet, ennek hatására T sejtekben gátlódik az IFN- γ képződés és fokozódik az IL-4 termelés (Th2 dominancia), a B sejtekben, pedig növekszik az IgE szintézis mértéke. Ez képezi az alapját a foszfodiesteráz gátló gyógyszerek alkalmazási lehetőségének AD-ben (67).

II.1.4. A bakteriális fertőzés és a Toll szerű receptorok szerepe atopiás dermatitisben

AD-ben az immunológiai folyamat beindításában és fenntartásában a legfontosabb élelmiszer és levegővel terjedő allergének mellett fontos szerephez jutnak a bőrre kerülő fertőző ágensek is. Ismert, hogy a klinikailag nem fertőzött tünetekkel rendelkező betegek esetében is 90%-ban kimutatható *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kolonizáció az ekzémás bőrterületen, valamint az, hogy antibiotikum kezelés klinikailag nem látható bőrfertőzés esetén is jelentős klinikai javulást eredményez (71,72). A gyakori *S. aureus*, egyéb baktérium, vírus és gombafertőzések kialakulásában számos tényező játszhat szerepet. A stratum corneum gyakori sérülése megteremti a lehetőséget a *S. aureus* számára, hogy az epidermális és dermális lamininhez és fibronectinhez kötődő sejtfelszíni receptoraival megtapadjon az ekzémás bőrön, míg a csökkent lipidtermelés miatt károsodik a lipidek bőrfelszínen kifejtett antibakteriális aktivitása (73,74). Kimutatott, hogy az antimikrobiális hatású cathelicidin és β -defenzin termelés is csökkent AD-ben (75).

A *S. aureus* által termelt toxinok (*Staphylococcus* Enterotoxin A, B, C, D, E és Toxikus Shock Szindróma Toxin-1) többféle mechanizmus útján is képesek fokozni az ekzémás gyulladást. A károsodott bőr felszínén átjutva szuperantigén hatásuk révén MHC restrikció nélkül direkt úton poliklonális T sejt aktivációt indítanak el. Ugyancsak képesek aktiválni a makrofágokat és a Langerhans sejteket, mely IL-1, IL-12 és TNF- α termelést eredményez. A makrofágok által termelt IL-1 és TNF- α fokozza a gyulladást, hatására E-selectin expresszió indul meg a vaszkuláris endotel sejteken, és ez elősegíti a CLA⁺ limfociták bőrbe történő bevándorlását (76). Az IL-12 hatására fokozódik a CLA felszíni expressziója a T sejteken és a Th1 sejtek érése révén a gyulladás krónikussá válásában is szerephez jut. Ugyancsak több vizsgáló közölte, hogy AD-ben a *staphylococcus* toxinok ellen specifikus IgE termelés is kimutatható. Ezen betegekben a bazofilok felszínére kötődő toxin specifikus IgE és a toxin kapcsolódását követően hisztamin felszabadulás mutatható ki. A toxin specifikus IgE szintje összefüggést mutat, az AD súlyosságával (77). A környezeti antigénekre specifikus IgE termelés mellett AD-ben saját autoantigének ellen is kimutatható antitesttermelés. Elsősorban a gyulladás következtében károsodott keratinocitákból kiszabaduló citoplazmatikus fehérjék ellen IgE típusú autoantitestek képződnek, melyek szintén hozzájárulnak a gyulladás további fenntartásához (78).

A Toll szerű receptorok (TLR) a természetes immunitás részeként csíravonalban kódolt olyan molekulák, amelyek elsődleges feladata a patogén kórokozók felismerése. A TLR-ok, valamint a CD14, a β_2 -integrinek (CD11/CD18), a C típusú lektinek, a scavenger-receptorok és a komplement-receptorok (CR1/CD35, CR2/CD21) alkotják az úgynevezett

mintázatfelismerő receptorokat (pattern recognition receptor, PRR). Ezek a sejtfelszínen expresszáldó, vagy szolubilis formában előforduló receptorok döntően a patogén mikrobiális ágensek jórészt közös vagy hasonló, a gazdaszervezetben nem képződő invariáns molekuláris struktúráit, az úgynevezett kórokozóhoz kapcsolódó molekuláris mintázatot (pathogen associated molecular pattern, PAMP) ismerik fel. A fontosabb PAMP ligandok közé tartoznak a lipopoliszacharidok (LPS), a bakteriális lipoproteinek (BLP), a peptidoglikánok (PGN), a lipoteicholsav (LTA), a nem metilált bakteriális CpG-DNS és az élesztő mannan. Az egyes TLR-okhoz más-más mikrobiális ligandok kötődnek, amit követően részben közös, másrészt viszont egyedi szignálútvonalakon keresztül transzkripció faktorok segítségével proinflammatorikus citokinek és adhézións molekulák átíródása jön létre és az adott TLR-ra jellemző immunológiai válaszok váltódnak ki (79-84). Nem ismertek adatok a TLR-ok számának és funkciójának változásáról AD-ben, melynek szerepe lehet a betegségben gyakori fertőzések kialakításában, illetve magában a patogenezisben is.

II.1.5. Extrinzik és intrinzik atopiás dermatitis

Az asthma bronchialehoz hasonlóan az AD-ben szenvedő betegeket is két csoportra lehet osztani. Az extrinzik AD-re (EAD) jellemző az emelkedett IgE szint, specifikus IgE jelenléte és pozitív bőrtesztek, míg az intrinzik formában, bár a klinikai tünetek megegyeznek az EAD tüneteivel, nem mutatható ki fokozott I. típusú hiperszenzitivitásra való hajlam, nincs kapcsoltns légúti vagy táplálék allergia, normál a szérum IgE szintje, nem detektálható specifikus IgE és a bőrtesztek is negatívak (85,86). A nem allergiás, intrinzik AD (IAD) előfordulását 16-45%-ra becsülik a teljes AD-es populáción belül az egyes vizsgálatok (87,88). Az AD két csoportjában, a bőrben lévő T sejtekben azonos mennyiségű IFN- γ termelést mutattak ki, de csökkent IL-5 és IL-13 termelést detektáltak az intrinzik formában (89,90). Szintén csökkent ebben a csoportban az epidermális dendritikus sejtek felszínén kimutatható Fc ϵ RI száma, de a perifériás vérben az eozinofil granulociták száma, élettartama és aktivitási foka nem mutatott lényeges eltérést az EAD csoporttól (91). A perifériás vér T limfociták aktivitása valamint citokin termelése tekintetében nem egységesek az irodalmi adatok. Novak és mtsai emelkedett IL-13 szérum szintet találtak IAD-ben, más szerzők viszont fokozott IL-4 és IL-5 szintet mértek EAD esetén a perifériás vér limfociták felülúszójában (92,93).

Az utóbbi években egy másik felosztást is javasol az irodalom: „tisztá” AD esetén a betegnél nem mutatható ki társuló egyéb atopiás betegség, „kevert” AD esetén más atopiás betegségek is diagnosztizálhatóak (93). A „tisztá” csoporton belül azonban továbbra is el lehet

különíteni az extrinzik és intrinzik formákat. Bizonyos megfigyelések szerint az extrinzik és intrinzik csoport nem élesen elkülönülő kategóriák, mivel évek alatt átmenet figyelhető meg az intrinzikból az extrinzik felé (94). Az IAD patogenezisében elsősorban a fertőző ágensek szerepét, a mikrobiális komponensekkel szembeni hiperreaktivitást emelik ki (95).

II.2. Psoriasis vulgaris és psoriasis arthropathia

II.2.1. Epidemiológiai és genetikai adatok

A psoriasis vulgaris egy genetikailag determinált, poligénesen öröklődő, a keratinociták fokozott proliferációjával, dermális gyulladással, érelváltozásokkal és immunológiai rendellenességekkel járó gyakori bőrbetegség. Prevalenciája a fejlett országokban átlagosan 2% körüli (96). A betegségre epidermális hiperproliferáció, akantózis, a keratinociták parakeratózisban megnyilvánuló differenciálódási zavara, a limfociták és polimorfonukleáris sejtek epidermisbe történő migrációja, és a dermális erek körül histiocitákból, limfocitákból és neutrofil granulocitákból álló gyulladós infiltrátum jellemző. A kórkép poligénis öröklődésű, az utóbbi években több olyan lókuszt sikerült azonosítani, amelyek összefüggésben állhatnak a psoriasisra való hajlammal (PSORS1-9), azonban jelenleg a felelős gének vagy géntermékek azonosítása még nem történt meg (97,98). Ugyancsak felmerült úgynevezett nem-kódotoló genomrészek lehetséges szerepe is a betegségre való hajlam genetikai meghatározottsága esetén (99). A genetikai determináció mellett számos külső és belső faktor kiválthatja, súlyosbíthatja a betegséget, például lázas állapot, Streptococcus infekció, krónikus gyulladás, különböző gyógyszerek, endokrin és alimentáris hatások, stressz vagy alacsony szérumszint. A psoriasist az immunmediált gyulladós kórképek (immune mediated inflammatory diseases, IMID) közé sorolják a reumatoid arthritissel és a Crohn betegséggel együtt. A betegség lényege egy jelenleg még nem azonosított (auto)antigén vagy antigének hatására kialakuló a bőrre, a bőr függelékeire és bizonyos ízületi struktúrákra lokalizálódó gyulladás, mely a veleszületett és a szerzett immunrendszer kórosan fokozott lokális reakciói miatt jön létre, és a genetikailag meglévő károsodott keratinocita homeosztázis esetén klinikai tünetek kialakulásához vezet (100-105). A folyamat a nem megfelelően működő immunreguláció miatt krónikussá válik (106).

II.2.2. Citokin vizsgálatok psoriasis vulgarisban

A psoriasis vulgaris a T1/T2 sejt arány változásának tipikus bőrgyógyászati példája, ahol az egyensúly felborulásaért elsősorban a T1 típusú sejtek számának, illetve funkciójának

fokozódása felelős, és számos irodalmi adat utal arra, hogy mind a lokális, mind a szisztémás citokin hálózat fontos szerepet játszhat a betegség patogenezisében (107-109). A lokálisan felszaporodott citokin termelő sejteket illetve az általuk termelt citokineket a bőrmintákból immunhisztokémiai és immunfluoreszcens módszerekkel, vagy in situ hibridizációval vizsgálták, illetve bőrbíopsziás mintákból és izolált T sejtekből citokin mRNS kimutatására alkalmas technikákkal detektálták (110-117). Ezen módszerek döntő többsége T1 típusú sejtek és citokinek dominanciáját mutatta ki a psoriasisos bőrben. Ezzel szemben a psoriasisos betegek bőrében IL-4+ T sejteket nem sikerült detektálni immunhisztokémiai módszerrel, áramlási citométerrel, RT-PCR-al, Western blot-tal, in situ hibridizációval és immunprecipitációval sem. (107-110,112-114,118). A fenti technikák egy részének hátránya, hogy csak a teljes sejtpopulációról és az összes sejt által termelt citokinekről képes információt szolgáltatni. Csak az immunhisztokémiai, immunfluoreszcens, ELISPOT módszerek valamint az izolált T-sejt klónok vizsgálata képes akár egyetlen sejtben is meghatározni a citokin expressziót. Ezen tesztek szenzitivitása, megbízhatósága és alkalmazhatósága azonban messze elmarad a citokin meghatározásra kifejlesztett multiparametrikus áramlási citometriás technikáktól.

Austin és mtsai psoriasisos betegek érintett plakkjaiból izolált mononukleáris sejteket vizsgálva a tünetes bőrterületeken az IFN- γ , IL-2 és TNF- α pozitív T1 sejtek számának szignifikáns emelkedését mutatták ki (119). Szabó és mtsai, valamint Friedrich és munkacsoportja hasonló eredményeket kaptak psoriasisos bőrtünetekből izolált T sejteken és igazolták, hogy a bőrben nem csupán a Th, de a Tc sejtekre is jellemző az 1-es típusú citokinek fokozott termelése (112,118). Ugyanakkor a fenti vizsgálatok egy részében a perifériás vér mononukleáris sejteket is elemezték, és azt mutatták ki, hogy a keringésben csupán a Th1 sejtek fokozott citokin termelése detektálható, Tc1 dominancia nem jellemző. Valamennyi vizsgálat hátránya, hogy szeparált perifériás vér mononukleáris sejtekkel vagy izolált T sejtekkel, T sejt klónokkal dolgozott. A szeparálás során pedig a sejtek számos funkciója megváltozhat, illetve elvesznek a természetes környezetükben lévő szérumkomponensek (120,121).

II.2.3. A psoriasisos arthropathia patogenezise

A psoriasisos arthropathia (PA) a szeronegatív spondylarthritisek csoportjába tartozó betegség, a psoriasisos betegek 30%-át érinti nagy valószínűséggel aluldiagnosztizálják (122). Kialakulásában számos tényező szerepét emeli ki az irodalom.

Genetikai faktorok

Ismert, hogy az első fokú rokonok között jelentős halmozódást mutat a betegség, ami a genetikai tényezők szerepére utal. Bizonyos HLA haplotípusokkal már évek óta ismert a PA kapcsolata. A 6. kromoszóma rövid karján elhelyezkedő HLA-B13, B17, B27, B38, B39, HLA-Cw6 génekkel és HLA-DRB1* haplotípussal való asszociáció mellett az utóbbi időkben a MICA-9 (MHC I chain related gene-9) génnek, a TNF- α gén különböző polimorfizmusainak, valamint a 16. kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő CARD-15 (caspase-activating recruitment domain-15) génnek a szerepe is felmerült (122-124).

Angiogenezis

PA-ban mind a bőrben, mind a szinoviális membránban kifejezett angiogenezis zajlik, aminek mértéke a rheumatoid arthritisben észlelténél jóval kifejezettebb. Ebben szerepet játszanak a VEGF (vascular endothelial growth factor), a TGF- β (transforming growth factor β), a PDGF (platelet derived growth factor) és az angiopoietinek egyaránt (125).

Citokinek

Centrális szereppel, nagy valószínűséggel a TNF- α és az IFN- γ bír a betegség szempontjából. Azok a tények, hogy PA-s betegekben mind a szinoviális membránban és folyadékban, mind a bőrben és a szérumban magasabb TNF- α szinteket mértek és a TNF- α gátló készítmények kifejezett klinikai javulást hoztak mind az ízületi, mind a bőrtünetek tekintetében arra mutatnak, hogy a TNF- α fontos a betegség kialakulása szempontjából (126). Ezen citokint a makrofágok, monociták, keratinociták, hízósejtek, dendritikus sejtek és aktivált T sejtek egyaránt termelik. A TNF- α fokozza bizonyos transzkripciók faktorok működését (pl. NF κ B, NF-AT1), ami számos proinflammatorikus citokin (pl. IL-1, IL-6) és kemokin termelődését vonja maga után. Hatására keratinocita hiperproliferáció, az ízületben pedig porc és csontkárosodás jön létre (127). A fibroblasztok és porcsejtek aktiválódnak, oszteoklaszt irányú differenciálódás indul meg, metalloproteázok termelődnek, ami folyamatos porc és csontdestrukcióhoz vezet. TNF- α felszabadulást követően mind a bőrben, mind az ízületben az endothel sejtek, keratinociták és dendritikus sejtek adhéziós molekulákat kezdenek el expresszálni, ami a gyulladásban részt vevő sejt elemek megtelepedéséhez és felszaporodásához vezet (125). Egyéb fontos citokinek termelése is megindul, a már említett IL-1 és IL-6 mellett kimutatták az IL-12, IL-15 és az IL-18 szintjének emelkedését is a PA-s betegek aktív ízületeiben.

Sejtek

Mind az epidermisben, mind a szinoviális membránban jelentős mértékű sejtes infiltrációt lehet kimutatni PA-ban. A sejtes infiltrátum döntő többségét a T limfocita populáció teszi ki (128). A szinoviális folyadékban és az ín és szalagtapadási helyeken dominálónan CD8⁺ T sejtek vannak jelen, a CD4⁺/CD8⁺ arány itt 1:2, szemben szinoviális membránban észlelt CD4⁺ sejt dominanciával (129). Több bizonyíték szól amellett, hogy elsőként a CD8⁺ T sejtek telepsznek meg az ízületi struktúrákban és ezek indítják el a gyulladásos immunválaszt (130). Emellett szól az a tény is, hogy CD4⁺ sejt deplécióval járó HIV fertőzött betegekben gyakori a PA kifejlődése (131).

Csont remodelling

A csont átépülése (remodelling) központi folyamat melynek eredménye döntően a periartikuláris csont felszívódása és ezzel párhuzamosan új csont képződése. A reszorpcióban a citokinek által aktivált oszteoklasztok, a reaktív újdonszövetképződésben pedig, az oszteoblasztok aktivitása játszik szerepet. Ezen folyamatban igen fontos a RANK (receptor activator of nuclear factor κ B) RANK-ligand (RANKL) út vonal (132). Az oszteoblasztok, a szinoviális membránt infiltráló T sejtek és csontvelői stroma sejtek felszínén kifejeződő RANKL az oszteoklasztok és az oszteoklaszt prekursorok RANK-jához kötődve oszteoklaszt aktivációt és fokozott csont reszorpciót indít el, melyet másodlagosan követ a reaktív csont újdonszövetképződés (133). Egy jelenleg formálódó elképzelés szerint, a bőrben lejátszódó folyamatok következményeként megemelkedett TNF- α szint a keringő oszteoklaszt prekursorok számát emeli. A prekursorok a psoriasisos ízületbe jutva RANKL-ot expresszáló sejtekkel kerülnek kapcsolatba, ami oszteoklaszt irányú differenciálódást és aktiválódást eredményez. Ez klinikailag a csont lebontás fokozódásához és csont újdonszövetképződéshez vezet az ízület melletti csont állományában (134). A fenti események fontos kapcsolatot jelentenek a bőrben zajló gyulladás és a PA kialakulása között.

II.2.4. Az aktív D₃ vitamin immunológiai hatásai

1,25 dihidroxivitamin D₃ [1,25 (OH)₂D₃], ami a D₃ vitamin biológiailag aktív metabolitja, nemcsak a csont és a kalcium metabolizmusában játszik fontos szerepet, hanem számos sejt differenciálódásában és az immunológiai szabályozásban is. A táplálékban felvételre kerülő D₃ vitamin mellett a szervezet legfőbb forrását a bőrben zajló D₃ vitamin bioszintézis jelenti. A májban és a vesében bekövetkező 1,25 hidroxilálás után képződő 1,25

(OH)₂D₃ aktív metabolitnak, mint ligandnak, a vitamin D receptorhoz (VDR) való sejtmagon belüli kötődése indítja el a biológiai hatásokat eredményező szignálokat (135,136). Az 1,25 (OH)₂D₃, a VDR-hez, mint nukleáris hormon receptorhoz ligandként kötődve a retinoid X receptorral (RXR) heterodimert képezve ligand aktivált transzkripciós faktorként működik. Az általa regulált gének promoter régiói közvetítésével az adott gén transzkripcióját aktiválja, vagy gátolja, ami az érintett targetsejtekben, a gén által kódolt fehérjék képzését eredményezi, vagy gátolja (137).

A VDR az immunrendszer legtöbb sejtjén jelen van, a monociták, a makrofágok és a dendritikus sejtek konstitutív expresszálják, a limfociták VDR expressziójára pedig indukált formában kerül sor (138). A 25 (OH)D₃ végső 1,25 (OH)₂D₃ hidroxilációját az 1- α hidroxiláz végzi, amely enzim nemcsak a vesesejtekben, de a makrofágokban, dendritikus sejtekben és a limfocitákban is megtalálható (139). A VDR jelenléte az immunrendszer sejtjeiben, valamint az 1- α hidroxiláz ezen sejtekben való aktiválódása így lehetővé teszi az 1,25 (OH)₂D₃-nak az immunszabályozásban való közvetlen részvételét.

Az aktív D₃ vitamin hatása az antigén prezentáló sejtekre

Amíg a legtöbb immunmoduláló szer fő hatása a T sejtekre irányul, addig az 1,25 (OH)₂D₃ széleskörű immunológiai szabályozó szerepe leginkább az antigén prezentáló sejtekben (APS) érvényesül. Az aktív D₃ gátolja a mieloid prekursorok dendritikus sejtekké való érését, differenciálódását. Kifejezetten csökkenti a dendritikus sejtek antigén prezentáló képességét, az MHCII, a CD80, CD86, CD40L, továbbá a CD1a, CD83 expresszióját (140,141). Az érett dendritikus sejtek aránya csökken az éretlen, kevésbé immunogénnek tekinthető fiatal dendritikus sejtekhez viszonyítva. Az aktív D₃ befolyásolja az APS-k citokin képzését, kiemelt jelentősége van annak, hogy csökken az IL-12 és fokozódik az IL-10 termelésük, továbbá fokozódik a szuppresszor hatású prostaglandin E₂ produkció (142,143).

A VDR agonistáknak a dendritikus sejtekre gyakorolt hatása tehát önmagában is a tolerogenitás és kevésbé az immunogenitás irányába tereli az immunrendszer működését azáltal, hogy a dendritikus sejtek érését és differenciálódását gátolják, és Th1 sejtek aktivitását közvetlenül serkentő IL-12 termelését mérséklék, az IL-10-ét pedig fokozzák.

Az aktív D₃ vitamin hatása a T sejtekre

Az 1,25 (OH)₂D₃ T limfocitákra kifejtett direkt hatása az antigén és lektin mediálta T sejt proliferáció és citokin termelés gátlásában nyilvánul meg. Az 1,25 (OH)₂D₃ gátolja a Th1 sejtek differenciálódásához szükséges citokinek termelését (144,145). A Th1 limfociták

kulcsfontosságú citokinjeinek, így az IL-2-nek és az IFN- γ -nak a transzkripciója gátlást szenved, de csökken a granulocita makrofág colónia stimuláló faktor (GM-CSF) szintézise is. A 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ gátolja az IL-2 szekrecióját azáltal, hogy az aktivált T sejt nukleáris faktornak (NF-AT) az IL-2 gén promoteréhez való kötődését akadályozza. Boonstra és mtsai szerint a Th1 gátlás melletti Th2 dominancia létrejöttéért a Th2 sejtekre gyakorolt direkt hatás is felelős (146). A Th2 sejtek aktív D $_3$ vitamin hatás melletti fokozott IL-4, IL-5 és IL-10 termelése kedvező állapotot teremt bizonyos autoimmun betegségekben és a szervtranszplantáció során kialakuló gyulladásos immunreakciók fékezése szempontjából. A Th1 sejtek működésének gátlását tehát kettős mechanizmussal biztosítja az aktív D $_3$, indirekt úton a dendritikus sejtekre gyakorolt érés és IL-12 termelés gátlásával, másrészt a Th1 sejtekre gyakorolt direkt negatív hatásával.

Az utóbbi időkben olyan in vivo adatok is napvilágot láttak, miszerint az 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ hatására kialakuló tolerogén dendritikus sejtek mellett, a CD4 $^+$ CD25 $^+$ regulatív funkciójú T sejtek aktiválódása is hozzájárul a tolerancia előidézéséhez (147,148).

II.2.5. Autoimmun betegségek és az aktív D $_3$ vitamin kapcsolata

Irodalmi adatok szerint a mérsékelt égöv alatt jóval gyakoribb a sclerosis multiplex (SM), az inzulin dependens diabetes mellitus (IDDM), a rheumatoid arthritis (RA) és a gyulladásos bélbetegségek (IBD) előfordulása, mint a trópusi éghajlaton. Egyes szerzők negatív korrelációt figyeltek meg az ultraviola sugárzás mértéke és a SM előfordulási gyakorisága között (149). Mások megerősítették, hogy a fiatal életkorban (6-15 év) a megemelkedett napsugár expozíció védelmet jelent a SM-el szemben (150). Viszonylag kevés adat áll rendelkezésre a SM és az aktív D $_3$ szérumszintjének összefüggését illetően. Oszteoporózisos SM betegek szérumszintjét vizsgálva azt találták, hogy igen gyakori a D $_3$ vitamin deficiencia (151). Figyelemreméltóak azok a megfigyelések, amelyek 4 hónapos időbeli elcsúszással, inverz korrelációt találtak az MRI-vel kimutatott aktív léziók mennyisége és a napsütéses órák száma között (152). Egyéb autoimmun betegségek, így IDDM, RA és IBD patogenezisének kutatása során is felmerült a gyanú, hogy a D $_3$ vitamin deficiencia egyike lehet a külső provokáló tényezőknek. Merlino és mtsai közleményében közel 30 000 nő prospektív megfigyelésének eredménye azt bizonyította, hogy nagyobb mennyiségű D $_3$ vitamin bevitel csökkenti a RA incidenciáját (153). Hasonló megfigyelések ismertek IDDM-ban, és Crohn betegségben is (154,155). Nem véletlenek azok a vizsgálatok sem, amelyek a VDR szerkezeti polimorfizmusának tisztázására irányulnak SM-ben, IBD-ben, IDDM-ben és RA-ban (156-159).

II.2.6. A psoriasis és az aktív D₃ vitamin kapcsolata

Az aktív D₃ vitamin (calcitriol) psoriasisban való alkalmazhatósága azt követően merült fel, hogy a 80-as évek második felében tenyésztett humán és egér keratinociták proliferációjának gátlását figyelték meg calcitriol jelenlétében, illetve egy oszteoporózisban szenvedő beteg psoriasisának tünetmentesedését írták le 1 α (OH) D₃ (alphacalcidol) szedése után (160-162). Később számos vizsgálat bizonyította a calcitriol és analógjai, a tacalcitol és calcipotriol hatékonyságát és biztonságosságát lokális alkalmazás esetén (162-166). Hatékonyságuk elsődlegesen a keratinociták differenciálódását elősegítő, proliferációt csökkentő hatásukból adódik, de lokális immunmoduláló effektussal is rendelkeznek. A kezelés hatására a bőrt infiltráló Th1 sejtek proliferációja és citokin termelése gátlódik, csökken a keratinociták IL-6 és IL-8 termelése, ezáltal mérséklődik a leukociták beáramlása, továbbá fokozódik a keratinociták apoptotikus elhalása, ami a psoriasis klinikai javulásához vezet (167-169). A szisztémás alkalmazás effektivitását is több vizsgáló közölte, elsősorban rövidtávú kezelésekről számoltak be (163-165,170). Perez és mtsai hosszú idejű (6 hónap-3 év) terápia mellett tanulmányozták a calcitriol hatékonyságát és biztonságosságát (171). 85 betegnél átlagosan 2,4 μ g dózist alkalmazva a betegek 88%-a észlelte a bőrtünetek bizonyos fokú javulását. A szerzők limitálták a diétával bevihető calcium mennyiségét és sem a szérumban, sem a vizeletben calcium szintben nem észleltek jelentős eltérést. Megfigyelték, hogy a calcitriol kezelés elsősorban az erythrodermiás és plakkos psoriasis formákban volt hatékony és a körömtünetek is jelentősen javultak. PA-ban szisztémás alphacalcidol alkalmazásáról csupán egy tanulmány számol be (172), immunológiai laboratóriumi vizsgálatok pedig nem ismertek.

II.3. Krónikus urticaria

II.3.1. Epidemiológia

Az urticaria a leggyakoribb bőrgyógyászati kórképek egyike, mely a populáció 15-25%-ban az élet folyamán legalább egy alkalommal jelentkezik (173). Míg az akut urticaria enyhe formája ritkán okoz diagnosztikai vagy terápiás problémát, addig a súlyos anafilaxiás shockkal, illetve Quincke oedemával társuló generalizált urticaria az életet veszélyeztető, azonnali beavatkozást igénylő betegség.

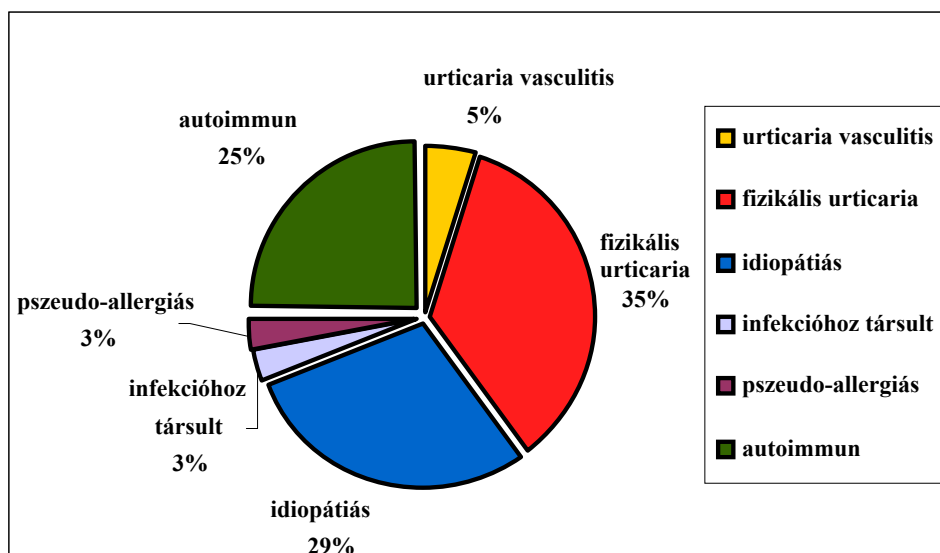
Az urticaria akut formájával ellentétben krónikus urticariában a csalánkiütéses epizódok több mint 6 héten keresztül fennállnak. A krónikus urticaria az életminőséget jelentősen befolyásoló, sokszor nehezen kezelhető kórkép. Bizonyos vizsgálatok szerint az

életminőség romlás összehasonlítható a kardiovaszkuláris betegségben szenvedő betegek életminőség romlásával, mivel a betegek szenvednek az állandó viszkető, égő bőrtünetektől, kimerültek a következményes alvászavartól, és bizonytalanság érzést okoz bennük az a tény, hogy számos esetben a modern orvostudomány sem tudja definiálni a háttérben álló kiváltó okokat (173,174). A betegség megközelítően a populáció 0,1-3%-át érinti, elsősorban felnőttkorban jelentkezik, és az esetek 50%-ában a csalánkiütések mellett angioedemas panaszok is fennállnak (175-179). A betegek csak mintegy felében múlnak el egy éven belül a panaszok és azon betegek 40%-ban akiknél, 6 hónapnál tovább fennállnak a tünetek akár 10 évig is perzisztálhat a betegség (175).

II.3.2. A krónikus urticaria etiopatogeneze

Mind az akut mind a krónikus urticaria esetében a klinikai tünetek megjelenéséért a szöveti hízósejtek degranulációja és a következményes mediátor felszabadulás felelős. A hízósejtek degranulációjának háttérében számos ok állhat, nem csupán a jól ismert IgE mediált I-es típusú allergiás mechanizmus. A mediátor felszabadulás immunológiai és nem immunológiai mechanizmussal jöhet létre allergén és allergén specifikus IgE találkozás, IgE-ellenes IgG antitestek, Fc epsilon receptor (FcεR) α lánc specifikus antitestek, citokinek, kodein, darázsméreg, arachidonsav metabolizmusba való beavatkozás (aspirin), fizikai faktorok (pl. hideg), C5a és P-anyag hatására. A nem immunológiai mechanizmusú degranulációt okozó darázsméreg, P-anyag, szintetikus poliamin (48/80) közvetlenül G-proteinen keresztül, az allergén specifikus IgE, IgE ellenes IgG antitestek, FcεRIα specifikus antitestek az FcεRI-on, a C5a pedig saját komplement receptorán hat.

A krónikus urticaria egyik legelfogadottabb etiopatogenetikai beosztását Charnetzkí készítette az 1980-as években, mely beosztás kiegészített formáját Husz írta le hazánkban először (180). 2000-ben, a Berlinben megtartott European Society of Dermatological Research szimpóziumon egy új konszenzus született az urticaria beosztásáról a háttérben álló mechanizmusok alapján (181). A két beosztás több pontban eltér egymástól és az egyik legfontosabb különbség, hogy ma már nem sorolják a krónikus urticaria csoportba az urticaria pigmentosa kórképet. A mindennapi klinikai gyakorlatban jól alkalmazható az a felosztás, melyet Grattan és mtsai javasoltak a krónikus urticaria betegségcsoport áttekintésére (182, 1. ábra). Ők alkalmazták a „közönséges” (ordinary) urticaria kifejezést először a krónikus urticaria azon eseteiben, amikor a fizikális urticariát (FU) és az urticaria vasculitist kizárták (183).



1. ábra: A krónikus urticaria leggyakoribb formái (közönséges urticaria= idiopátiás + infekcióhoz társult + pszeudoallergiás + autoimmun, Grattan 2002).

Fizikális urticariák

A krónikus urticaria egyik leggyakoribb formája a fizikális urticaria (FU) csoport, melyre jellemző, hogy a csalánkiütések közvetlenül a bőrt ért fizikai inger hatása után jelennek meg és gyorsan, néhány perc, 1-2 óra alatt elmúlnak (180). Az egyetlen kivétel a késői nyomási urticaria, ahol 2 vagy több óra után alakulnak ki az urticák a nyomás helyén és 24 óráig ill. tovább fennállnak. A FU-ák nem ritkán egymással társulva fordulnak elő egy-egy betegen (174,184). A leggyakoribb formák a kolinerg urticaria (C), amely jó prognózisú és jellemző rá a fizikai munkavégzés, pszichés stressz vagy meleg fürdő következtében kialakuló viszkető apró urticák kialakulása, valamint az urticaria factitia (szimptomás dermatografizmus, D), mely dörzsölés, vakarás következtében jön létre (185,186). Ismertek még a hideg, meleg, napfény, víz, nyomás és vibráció kiváltotta urticariák. A FU-akat az anamnézis gondos felvételével, fizikális vizsgálattal és könnyen elvégezhető provokációs tesztekkel lehet diagnosztizálni.

Élelmiszerek szerepe

A krónikus urticaria hátterében álló ételallergiák előfordulási gyakoriságáról, illetve szerepéről megoszlanak a vélemények. Az élelmiszerek közül a halfélék, a tej, a gabonafélék, a dió, bizonyos zöldségek és gyümölcsök IgE mediálta valódi I-es típusú immunreakció, a tojásfehérje, a tiamin (sajt) és a földieper direkt hisztamin felszabadítás, míg a sajtok, a sör, egyes konzervek, zöldségek, gyümölcsök (paradicsom, avokádó, ananász), néhány halféle és borok vasoaktív-amin tartalmuk révén válhatnak ki csalánkiütést (187,188). Egyes szerzők

szerint a krónikus urticaria hátterében a felsorolt mechanizmusok ritkán mutathatók ki, sokkal gyakoribb az ételben található mesterséges additív anyagok kiváltotta pszeudoallergiás vagy intolerancia reakció. Ezen étel additívumok lehetnek ételszínezékek, illetve tartósítószer (benzoesav származékok, azo festékek (174,184). Ugyanakkor más vizsgálok a természetesen előforduló pszeudoallergének (paradicsom, bor) fontosságát is hangsúlyozzák a mesterséges additívumok mellett (189).

Gyógyszerek szerepe

Ugyancsak ritka a valódi gyógyszerallergia a krónikus urticaria hátterében. A gyógyszerek elsősorban nem IgE mediált I-es típusú hiperszenzitivitási reakció útján, hanem intolerancia reakciók révén váltanak ki krónikus csalánkiütést. Kimutatott, hogy az Aspirin szedése a krónikus urticariában szenvedő betegek közel 30%-ában okoz exacerbációt és ez dózisfüggő intolerancia reakció (190). Szintén intolerancia reakció révén vezetnek a nem szteroid gyulladásgátló gyógyszerek krónikus urticaria kialakulásához. A krónikus urticariában az említett gyógyszer csoportoknak nem oki szerepet tulajdonítanak, elsősorban a tünetek provokálását, exacerbáció megjelenését okozzák (191).

Gócfertőzés szerepe

Régebben nagy szerepet tulajdonítottak a krónikus urticaria kialakulásában a különböző bakteriális göcfertőzéseknek, candida fertőzésnek, illetve parazita fertőzésnek. Az utóbbi évek vizsgálatai alapján azonban ezek előfordulási gyakorisága, mint valódi patogenetikai tényező igen kicsi (174). Számos tanulmány jelent meg a krónikus urticaria és a *Helicobacter pylori* (Hp) fertőzés kapcsolatáról, mely az irodalmi adatok tükrében ugyanolyan ellentmondásosnak tűnik, mint az ételallergiák és a krónikus urticaria viszonya (192). Több vizsgálat is szoros összefüggést talált a Hp fertőzés és a krónikus urticaria kialakulása között, miután a Hp eradikációt követően az urticariás betegek 95-100%-ban remisszió alakult ki (193). Ugyanakkor újabb vizsgálatok ezt nem támasztják alá és nem találtak kapcsolatot a Hp fertőzés, valamint a krónikus urticaria tünetei között (194-196). Az ellentmondás egyik oka lehet a vizsgált populációkban mutatkozó eltérő Hp fertőzési prevalencia.

Urticaria vasculitis

Ma már nem sorolják az urticaria csoportba az urticaria vasculitist, mely egy önálló kórkép. Fontos azonban és gyakran nem könnyű feladat a különböző krónikus urticaria formáktól való differenciálás. Az urticaria vasculitisre jellemző, hogy a csalánkiütések

általában 2-3 napig, tehát több mint 24 óráig állnak fenn és nem tünetmentesen múlnak el, hanem purpurákat, barnás makulákat hátrahagyva (197). A léziók inkább égő, fájdalmas érzést, kevésbé viszketést okoznak és bizonyos esetekben szisztémás tünetek, mint pl. arthralgia, láz, uveitis, episcleritis, hasmenés, hasi és mellkasi fájdalom is felléphetnek (198). Az urticaria vasculitis lehet önálló, primer kórkép és lehet szekunder betegség, amikor valamely háttérben álló egyéb betegséghez kapcsolódik (199-201). Az urticaria vasculitist a krónikus urticariától szövettani vizsgálattal kell elkülöníteni.

Krónikus idiopátiás urticaria

Amennyiben kizártuk a krónikus urticaria háttérében álló FU, urticaria vasculitis, gócfertőzés, gyógyszer intolerancia vagy élelmiszer pseudoallergia provokáló szerepét krónikus idiopátiás urticariáról (KIU) beszélhetünk. Ezen csoporton belül különítették el az utóbbi évtizedben az autoimmun mechanizmusokkal magyarázható autoimmun urticaria csoportot (AIU).

II.3.3. Autoimmun urticaria

Grattan és mtsai már 1986-ban rámutattak egy hisztamint felszabadító szérumfaktor jelentőségére krónikus urticariában. Leírták, hogy a krónikus urticariás betegek többségében a saját szérum intrakután beadása után csalárgöb keletkezik a betegség aktív szakaszában, míg tünetmentesen ez nem figyelhető meg (202). Később igazolták, hogy mind a bőrreakció, mind az egészségesek perifériás bazofil sejtjein krónikus urticariás szérumok hatására létrejövő hisztamin felszabadító hatás, IgG típusú anti IgE autoantitesteknek tulajdonítható és ezen antitestek a betegek kb. 10%-ban patogenetikai szereppel is bírnak (203). Miután az anti IgE antitestek jelenléte önmagában nem magyarázta a krónikus urticariás szérumok teljes hisztamin felszabadító hatását, az immunglobulin természetű faktorok vizsgálata folytatódott. Hide és mtsai megállapították, hogy a krónikus urticariás betegek egy részének széruma a bazofil sejteken és hízósejteken lévő nagy affinitású Fc epsilon receptor α lánc (Fc ϵ RI α) elleni IgG autoantitesteket is tartalmaz, melyek egészséges donorok bazofil sejtjein in vitro hisztamin felszabadító aktivitást mutatnak (204). Később igazolódott, hogy az Fc ϵ RI α specifikus autoantitestek egy része a receptor α 2 doménjéhez kötődve kompetícióban áll az IgE molekulával, míg másik része az α 1 doménhez kapcsolódva nem mutat kompetíciót az IgE-vel (182,204,205). Az Fc ϵ RI α ellenes antitestek további vizsgálatában számos kutatócsoport vett részt (206-209). Az Fc ϵ RI az IgE molekulákat nagy affinitással kötő komplex felépítésű receptor, mely elsősorban a hízósejteken és a bazofil granulocitákon

expresszálódik (210). A MIRR (Multisubunit Immune Recognition Receptor) családba tartozik. A tetramer molekula egy 45 kDa-os α -, egy 33 kDa-os β - és két 9 kDa-os γ -láncból áll. Az α -alegység extracelluláris doménje alakítja ki a receptor kötőhelyét, míg a β - és γ -alegységek az intracelluláris jelátvitelben vesznek részt. Az IgG autoantitestek közvetlenül keresztkötik a szomszédos receptorokat, amely kiváltja a hízósejtek és a bazofil sejtek aktivációját. Ez mind a sejtmembránban, mind intracellulárisan jelátviteli folyamatokat indít el. A keresztkötődést követően protein-tirozin-kinázok, majd foszfolipáz C aktiválódása figyelhető meg, ami foszfatidil-inozitol-biszfoszfát hidrolízist és másodlagos hírvívó molekulák, inozitol-trifoszfát (IP3) és diacil-glicerol (DAG) képződését eredményezi. Az IP3 intracelluláris kalciumot szabadít fel, míg a DAG protein kináz C-t aktivál (210). A folyamat eredménye az allergiás mediátor anyagok felszabadulása, mely másodperceken belül végbemegy a specifikus receptor ligandkötését vagy specifikus antitest keresztkötését követően. A tisztított Fc ϵ RI α ellenes antitest önmagában is képes bazofil degranulációt előidézni a sejtfelszíni receptorok keresztkötése révén, azonban komplement jelenléte jelentősen fokozza a degranuláció mértékét (211). Feltehetően a komplement aktiváció hisztamin felszabadításban játszott jelentős szerepére utal az is, hogy az Fc ϵ RI α specifikus antitesttel rendelkező betegek csupán bőr tünetekben szenvednek, tüdő vagy egyéb szervi érintettségük nincs. A bőrben elhelyezkedő hízósejtek felszínén ugyanis kimutatható komplement receptor, míg a tüdőben lévő hízósejteken nem, de a sejtek közötti funkcionális heterogenitás is jelentős (212,213).

A KIU csoporton belül tehát elkülönült az AIU csoport, melyre jellemző a nagy affinitású Fc ϵ RI α lánc ellen (30-40%) vagy ritkább esetben (5-10%) az IgE molekula ellen termelődő autoantitestek jelenléte a betegek szérumában (204,206,211). Az AIU előfordulása a KIU csoporton belül 30-50%-ra tehető. Az antitestek döntően az IgG1, vagy IgG3 alosztályba tartoznak, funkcionálisan aktívak (207). Patogenetikai szerepükre utal, hogy kimutathatóságuk negatív korrelációt mutat a betegek bazofil sejt számával, a betegek bőrébe injektálva csalárgöb képződéséhez vezetnek in vivo, hízósejtekből és bazofil sejtekből hisztamin felszabadítását idézik elő in vitro, plazmaszintjük korrelál a betegség súlyosságával és plazmaferézissel eltávolítva a szérumból a betegek tünetmentessé válnak (214-217). Egyéb autoimmun betegségek, mint szisztémás lupus erythematosus (SLE), dermatomyositis, pemphigus és pemphigoid esetén is kimutattak Fc ϵ RI α elleni autoantitesteket a betegek szérumában, azonban ezek az antitestek funkcionálisan minden esetben inaktívnak bizonyultak és nagyrészt az IgG2 és IgG4 alosztályba tartoztak (207). Horn és mtsai egy

érzékeny ELISA teszt segítségével nem funkcionáló anti FcεRIα antitesteket tudtak kimutatni egészséges egyének szérumában is (218). Feltételezésük szerint ezek a természetes antitestek akkor válnak patogénné, ha az FcεRI és természetes ligandja az IgE molekula közötti egyensúly megbomlik (219). Az AIU-ra jellemző a más autoimmun betegségekkel elsősorban autoimmun thyreoiditissel való társulás, női dominancia és a HLA-DRB1*04 (DR4) allél gyakoribb előfordulása (184,220-223). Ismert az immunmoduláns kezelésekre adott jó terápiás válasz, elsősorban plazmaferezissel, nagy dózisú intravénás immunglobulinnal és cyclosporin A kezeléssel elért sikerekről számol be az irodalom (215,216,224).

II.3.4. Citokinek szerepe krónikus urticariában

Krónikus urticariás bőr szövettani feldolgozása során Sabroe és mtsai megállapították, hogy a neutrofil, eozinofil és CD3+ T sejt akkumuláció már a kb. 4 órája fennálló csalánkiütésekben is kialakul (225). Az eozinofil aktiváció az autoantitestekkel nem rendelkező betegek között a 12 óránál hosszabb ideig fennálló csalánkiütésekből származó mintákban sokkal kifejezettebb, mint az autoantitest pozitív urticariásokban (225). Ying és mtsai vizsgálatában a kontrollok bőrmintájával összehasonlítva az urticariás mintákban az eozinofilek, neutrofilek, bazofilek, makrofágok száma szignifikánsan magasabb, a triptáz pozitív hízósejtek száma szignifikánsan alacsonyabb volt (226). A CD3+, CD4+, CD8+ és a CD25+ T sejtek száma jelentősen emelkedettebb volt urticariában, mint egészséges kontrollokban és hasonló sejtes infiltrátum volt megfigyelhető atopiások allergén expozíció hatására kialakult reakciójában, 24 órás időtartamot követően is. Nem volt különbség a bazofil hisztamin felszabadítás alapján autoantitest pozitívnak tartott, illetve negatív esetekben egyik sejtípusra vonatkoztatva sem. A citokineket vizsgálva megállapították, hogy allergén indukálta késői típusú bőrreakcióban az IL-4 és IL-5 mRNS expresszió fokozott, az IFN-γ mRNS expresszió csökkent, míg krónikus urticariában az IL-4, IL-5 és IFN-γ expresszió is emelkedett volt a normál kontrollokhoz képest. Mindezek alapján krónikus urticariában a Th0 fenotípust találták jellemzőnek a bőrben, de az is elképzelhető, hogy aktivált Th1 és Th2 sejtek keveréke által létrehozott citokin környezet jött létre. Saját vizsgálataink indulásakor nem voltak ismert mérések a perifériás vér T sejtek citokin mintázatára nézve krónikus urticariában.

II.3.5. A krónikus urticaria kivizsgálása

Ezen ismeretek alapján a krónikus urticaria kivizsgálásában a következő lépések ajánlottak. Nagyon gondos és részletes anamnézis felvétellel az említett exacerbációt okozó gyógyszereket azonosítani lehet, ezeket el kell hagyni. Amennyiben az anamnézis és a fizikális vizsgálat alapján urticaria vasculitis lehetősége merül fel, szövettani vizsgálattal, amennyiben FU, fizikális provokációs tesztekkel (dermografizmus, jégkocka teszt, meleg teszt, nyomási teszt, fényteszt, kolinerg próba stb.) tudjuk a végső diagnózist felállítani. Ezt követően a fizikális vizsgálat alapján felvetődő fertőzések tisztázására laboratóriumi vizsgálatokat (We, vérkép, AST, vizelet), gyomorpanaszok esetén Hp. meghatározást kell végezni. Az emelkedett eozinofil sejtszám parazitológiai fertőzést jelezhet, s széklet parazitológiai vizsgálat szükséges, míg a további laboratóriumi eltérések a háttérben álló esetleges egyéb fertőzésre, illetve más belgyógyászati kórképre utalhatnak. Amikor élelmiszer vagy élelmiszer additívum szerepét feltételezzük az urticaria hátterében, akkor a betegnél szigorú beépítéses diétát kell alkalmazni, illetve ha módunkban áll, akkor a kettős vak placebo kontrollált élelmiszer provokációt, valamint a kettős vak, placebo kontrollált élelmiszer additívum provokációt kell kivitelezni. Amennyiben kizártuk a FU, gyógyszer, élelmiszer vagy gócfertőzés provokáló szerepét, illetve urticaria vasculitis lehetőségét, a KIU csoporttól el kell különítenünk az AIU csoportot.

II.3.6. Az autoimmun urticaria diagnosztikája

A klinikai tünetek AIU-ban súlyosabbak, szövettani vizsgálattal kifejezettebb az eozinofil degranuláció a szövetekben és a perifériás vérben csökkent bazofil sejtszámot lehet kimutatni a nem autoimmun formákkal összehasonlítva, de csupán ezen eltérések alapján nem lehet az AIU diagnózist felállítani (184,191). A klinikai gyakorlatban segítséget jelent az autológ szérumbőrteszt (ASST) alkalmazása (227). Az ASST az AIU meghatározásában szűrő eljárásnak számít. Ennek a funkcionális módszernek az előnye, hogy gyors és könnyen elvégezhető, hátránya, hogy valódi antitest jelenlétét nem tudjuk kimutatni, csupán az ún. autoreaktivitást jelzi a szérumban. Az autoreaktivitás utalhat funkcionális anti-FcεRIα autoantitest, anti-IgE antitest ill. egyéb szérumfaktorok jelenlétére. Az ASST specificitása 69%, szenzitivitása 70% (227). Álnegatív eredmény ritkán, de előfordulhat az autoantitestek *in vitro* módszerekkel igazolt jelenlétében is, ha az autológ szérumot olyan bőrterületbe injektálták, amelyet egy korábbi csalánkiütés átmenetileg refrakterré tett (227). Gyakoribb az álpozitív reakció, így egyes szerzők ennek csökkentésére az ASST 1/10 hígítású szérummal való végzését javasolják (228). Az irodalomban elfogadott vélemény szerint az ASST

eredményét specifikus laboratóriumi vizsgálattal szükséges megerősíteni, funkcionális vagy kötődési tesztekkel (3. táblázat).

| I. Funkcionális tesztek | II. Kötődési tesztek |
|--|-----------------------------|
| 1. Autológ szérumbőrteszt | 1. Western blot |
| 2. Bazofil hisztamin felszabadulási teszt (HR) | 2. ELISA |
| 3. Hízósejtekből történő hisztamin felszabadulás mérése | |
| 4. β -hexózaminidáz felszabadulás vizsgálata patkány bazofil leukémia sejtvonalból | |
| 5. Bazofil CD63 felszíni expresszió vizsgálata (BAT) | |

3. táblázat: Az AIU diagnosztikája során alkalmazható módszerek.

Funkcionális tesztek

A funkcionális tesztek segítségével kimutathatók a betegek szérumában keringő funkcionálisan aktív antitestek és/vagy biológiailag releváns szérumbelvonatok, azonban kevés információt szolgáltatnak a kérdéses molekulák szerkezetéről (207). Közülük a bazofil hisztamin felszabadulási (HR) teszt jelenleg a legáltalánosabban elfogadott „gold standard” eljárás AIU-ban az autoantitestek detektálására, de nehéz a teszt standardizálása és időigényes (211,214,229,230). A módszer azon alapul, hogy az AIU betegek szérumában található funkcionális autoantitestek hisztamin felszabadulást váltanak ki egészséges egyénekből izolált bazofil granulocitákból vagy hízósejtekből, melynek kimutatásához az ELISA vagy RIA technikát alkalmazzák. Amennyiben kevés IgE található a donor bazofil sejtek felszínén, akkor a funkcionálisan aktív Fc ϵ RI α ellenes (IgE kompetitív és non-kompetitív) antitesteket lehet kimutatni, magas IgE telítettségű donorsejtek esetén az IgE ellenes és a non-kompetitív Fc ϵ RI α ellenes antitesteket lehet detektálni. Emiatt a módszer kivitelezéséhez rendszerint kétféle donort használnak, alacsony és egy magas sejtfelszíni IgE számmal rendelkező bazofil sejteket. A különböző tanulmányokban a KIU szérumok 27-52 %-ban bizonyultak pozitívnak a HR vizsgálatokban, a kiválasztott beteg populáció és az alkalmazott donorsejtek függvényében (211,230).

A HR teszt és az ASST közötti korrelációt vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak. Sabroe és mtsai összefüggést találtak az autológ szérumbelvonatokra adott pozitív bőrteszt és a hisztamin felszabadulást indukáló anti Fc ϵ RI antitestek jelenléte között (230). Másfelől egyes munkacsoportok egyetértenek abban, hogy az ASST+ betegeknek csupán egy része képes HR-t kiváltani, ami az álpozitív ASST eredmények következménye (184,230,231).

Asero és mtsai úgy tudták emelni a HR teszt szenzitivitását, hogy hat különböző donorsejtet alkalmaztak az ASST+ krónikus urticariás szérummal való inkubáláshoz (232). Kísérletük során azt a következtetést vonták le, hogy bár néhány vizsgálatban bizonyos egyéni tényezők szabályozzák a hisztamin felszabadulást, a legtöbb krónikus urticariában szenvedő ASST+ beteg széruma képes volt *in vitro* hisztamin felszabadulást indukálni kellően érzékeny donorsejtek alkalmazása esetén.

Kötődési tesztek

A kötődési tesztek segítségével direkt módon azonosíthatók be a betegek szérumában jelenlévő immunreaktív anti FcεRIα vagy anti IgE antitestek (206,207,211,229,230). Az immunreaktív antitesteknek azonban csak egy része funkcionálisan aktív, másik része nem okoz funkcionális hatást. A kötődési tesztek hátránya, hogy sem a Western blot, sem az ELISA módszer nem különbözteti meg a funkcionális hisztamin felszabadító autoantitesteket a nem funkcionális autoantitestektől, a funkcionálisan nem aktív antitesteket is kimutatják, valamint, hogy a használatuk során elvesznek a konformációs epitópok (206,207). A Western blot és ELISA módszerek alkalmasak lennének nagyobb mennyiségű szérum szűrésére is, de nem váltották be a korábban hozzájuk fűzött reményeket, nem kaphatók a kereskedelembe és használatuk során álnegatív és álpozitív eredmények is adódhatnak. A HR teszt és a Western blot vizsgálat eredményei között Fiebigger és mtsai korrelációt mutattak ki, míg Kikuchi és mtsai nem tudták ezt később megerősíteni (206,211).

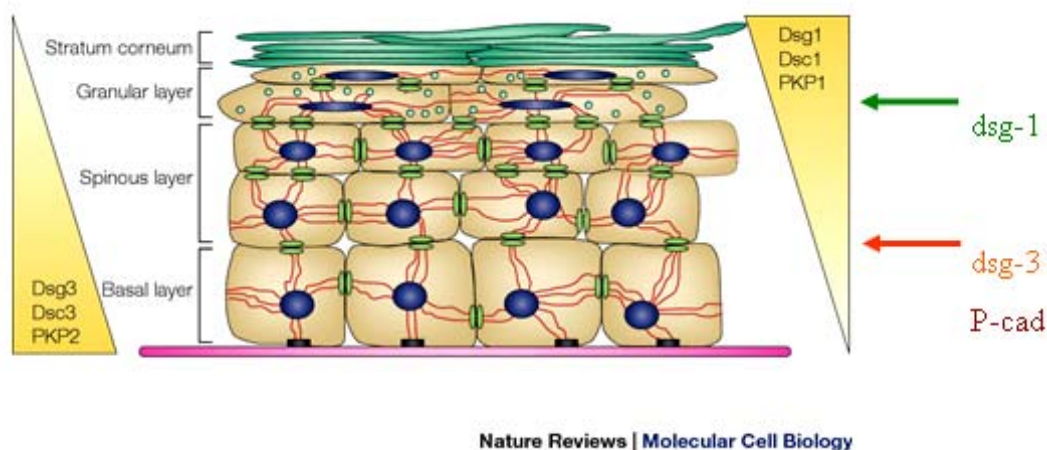
Az AIU diagnosztikája tehát jelenleg nem megoldott. Új, könnyen kivitelezhető, elsősorban funkcionális alapon működő tesztekre lenne szükség, melyek a funkcionális IgE vagy FcεRIα ellenes autoantitestek gyors, megbízható kimutatására alkalmasak.

II.4. Az adhézións molekulák

II.4.1. Adhézións molekulák a bőrben

Az epithel sejtek a szöveti struktúrális integritást többféle kapcsolódási mechanizmus révén, többek között adherens junkciókon és dezmoszómákon keresztül tartják fenn. Mind két típusú kapcsoló komplex a cadherin szupercsaládba sorolható adhézións molekulákat tartalmazza. Az adherens junkciókat a klasszikus cadherineknél – úgymint az E- és P-cadherin (P-cad) – alkotják, amelyek catenineken keresztül a citoskeleton felépítő aktinnal állnak kapcsolatban. A dezmoszómákban pedig a dezmoszómális cadherineknél találhatók – a desmogleineknél (dsg) és a desmocollineknél (dsc) –, amelyek intermedier filamentumok révén a

keratinrendszerrel tartanak fenn kapcsolatot (233) Megkülönböztetünk dsg-1, 2, 3 és legújabban 4 izoformákat, valamint dsc-1, 2 és 3-at. Míg a dsg-2 és dsc-2 minden dezmoszómát tartalmazó szövetben megtalálható, addig a dsg-1 és 3, valamint a dsc-1 és 3 csak a többrétegű epithelben fordul elő (234).



2. ábra A vizsgált dsg-1, dsg-3 és P-cad kifejeződése a humán bőr epidermisében

A dsg-1 csak többrétegű laphámban található, azon belül is túlnyomórészt az epidermis magasabb rétegeiben (2. ábra). Ezzel szemben a dsg-3 más többrétegű hámban is előfordul. Az epidermisben jellegzetes előfordulási helye a stratum basale és a stratum spinosum alsó sejtsora (235). A klasszikus cadherineknél közül az E-cad az epidermisz valamennyi sejtrétegében kifejeződik, a P-cad azonban csak a bazális sejtek felszínén expresszálódik (236).

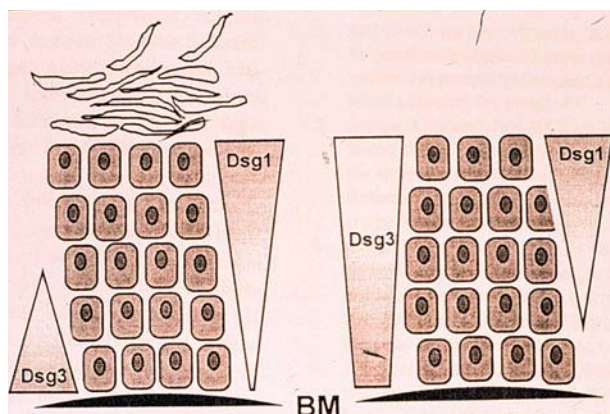
II.4.2. Az adhéziós molekulák bőrgyógyászati vonatkozásai – Pemphigus betegségcsoport

A dezmoszómális cadherineknél autoimmun mechanizmus vagy toxin okozta káros hatások célpontjai olyan humán megbetegedésekben, mint például a pemphigus vagy bullosus impetigo (237). Ezek közül a pemphigus a bőr és a nyálkahártyák egy potenciálisan halálos kimenetelű autoimmun hólyagos betegsége, amit a sejtfelszínhez kötődő antitestek következtében, a keratinociták között kialakuló intercelluláris kapcsolat hiánya (akantolízis) jellemez (238).

Pemphigus vulgarisban, mely a betegségcsoport leggyakoribb formája, a tünetek leggyakrabban a szájnyálkahártyán kezdődnek, ritkán egyéb nyálkahártyák pl. nyelőcső, hüvely, húgycső, conjunctiva is érintettek lehetnek (239). A nyálkahártyatünetekkel egyidőben, vagy azt követően, elsősorban a törzsön és a hajas fejbőrön jelentkezhetnek a petyhüdt falú hólyagok, melyek könnyen rupturálva eróziót hagynak maguk után. A betegség

hisztopatológiai jele a szuprabazális akantolítikus hólyag. A pemphigus vegetans a pemphigus vulgaris egy variánsa, leggyakrabban a hónaljban és a lágyékhajlatban fordul elő (240). A pemphigus csoport másik gyakori formáját a pemphigus foliaceus felületesebben, a stratum granulosumban megjelenő akantolítikus hólyagok jellemzik, melyek könnyen rupturálnak, eróziót, pörköt hagyva maguk után. A pemphigus vulgarissal ellentétben nincs nyálkahártyatünet, a léziók leggyakrabban az arcon, nyakon, törzsön fordulnak elő (239). A pemphigus foliaceus endémiás formáját találták Brazíliában, valamint Columbia és Tunézia bizonyos területein (Brazíliai pemphigus = fogo selvagem) (240,241). A bőrlézióból vett minta direkt immunfluoreszcens vizsgálatával mindkét pemphigus típusnál IgG volt detektálható a keratinociták felszínén (242).

A jellegzetes klinikai és szövettani kép, valamint az immunfluoreszcenciával megfigyelhető eltérések azt sugallták, hogy az autoantitestek potenciális célpontjai pemphigusos betegekben a dezmoszómák. Molekuláris biológiai és immunhisztokémiai tanulmányok azonosították, hogy a pemphigus vulgaris antigén egy 130 kDa-os glikoprotein, a *dsg-3* (243-246). A betegekben elsősorban IgG4 típusú patogén autoantitestek detektálhatók, melyek a *dsg-3* öt extracelluláris doménje közül a 2-es, ritkábban az 1-es ellen irányulnak (247,248). Pemphigus vulgarisban bár a fő autoantigén a *dsg-3* extracelluláris lánc, a dezmoszómák egyéb transzmembrán komponensei ellen mint például a *dsg-1* vagy *dsc* is kimutatható autoantitest termelés (244). Később kiderült, hogy a pemphigus foliaceus legfőbb autoantigénje a 160 kDa-os *dsg-1* (249).



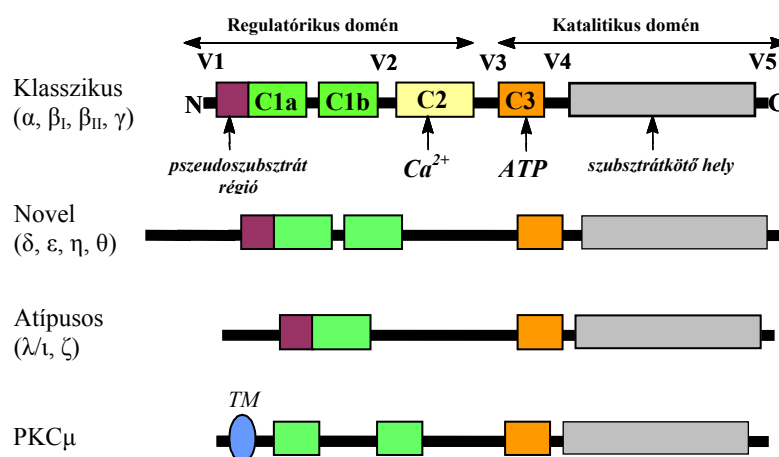
3. ábra: A *dsg-1* és *dsg-3* megoszlása epidermisben és nyálkahártyán.

Nyálkahártyatünetetek a klinikai megfigyeléseknek megfelelően pemphigus foliaceusban nem jelentkeznek, a pemphigus vulgarisos betegek többségében igen. Ennek oka, hogy a *dsg-1* és *dsg-3* nem egyformán oszlik meg a bőr és a nyálkahártya különböző

rétegeiben. A *dsg-3* a nyálkahártya teljes vastagságában megtalálható nagy mennyiségben, míg a *dsg-1* csupán a nyálkahártya felszínéhez közeli rétegekben fordul elő. A bőrben ezzel szemben a *dsg-3* jellemzően az alsóbb rétegekben található meg, a *dsg-1* pedig a hám teljes vastagságában kimutatható, legnagyobb mennyiségben az epidermis felsőbb rétegeiben (3.ábra). Ezzel magyarázható, hogy a pemphigus foliaceus betegeknek nincs nyálkahártyatünetük, mert bár a *dsg-1* ellenes antitestek károsítják a sejtek közötti kapcsolatot, a nagyobb mennyiségű *dsg-3* képes fenntartani a nyálkahártya épségét, a bőrben azonban ez nem lehetséges, ezért ott felszínesen hólyagok jelennek meg. A pemphigus vulgaris betegekben a *dsg-3* ellenes antitestek jelenléte magyarázza a súlyos nyálkahártyatünetek megjelenését. Amennyiben kizárólag *dsg-3* ellenes antitesttel rendelkezik a beteg, bőrtünet nem jelenik meg, azon pemphigus vulgaris betegeknek viszont, akik mind *dsg-3*, mind *dsg-1* ellenes antitesttel rendelkeznek, bőrtünetük is van (250). Ezek a megfigyelések vezettek el a „*dsg* kompenzáció” elnevezésű teóriához, amely feltételezi, hogy a *dsg-1* létre tudja hozni az adhéziót a *dsg-3* nélkül is, és fordítva (237).

II.4.3. A protein kináz C izoenzimek

A protein kináz C (PKC) izoenzimcsalád a szerin/treonin kinázok egyik jelentős képviselője. A mai napig legalább 11 különböző PKC izoenzimet azonosítottak (251,252), melyeket szerkezeti jellegzetességeik, valamint aktivációs mechanizmusaik alapján 4 nagyobb csoportba sorolhatunk (4. ábra).



4. ábra A PKC izoenzimcsalád szerkezeti jellemzői

A "klasszikus" csoportba (cPKC) 4 izoenzim tartozik: a PKC α , β_I , β_{II} és γ . Ezen izoenzimek közös jellemzője, hogy calcium- és diacyl-glicerol- (DAG), illetve annak exogén megfelelőjeként működő forbol-észter-dependensek, vagyis aktiválásukhoz ezen anyagokat kofaktorként igénylik. A második csoportba a nem calcium-dependens PKC δ , ϵ , η és θ izoenzimek tartoznak, melyeket "novel" PKC-nek (nPKC) is szokás nevezni. Közös jellemzőjük, hogy calcium nélkül, forbol-észterekkel (illetve DAG-lal) is maximálisan aktiválhatók. A harmadik csoportba az "atípusos" izoenzimek sorolhatók (aPKC), melyek közé a PKC ζ és λ/ι izoenzimek tartoznak; lényeges tulajdonságuk, hogy aktiválódásukhoz sem calciumot, sem forbol-észtert nem igényelnek. Végezetül külön csoportba sorolható a PKC μ , mely mind aktivációját, mind strukturális jegyeit tekintve rendhagyó izoformának tekinthető. A PKC izoformák általános aktiválódásának sémája egy többlépcsős eseménysorral jellemezhető (251-253).

Szervezetünknek nincs olyan sejttípusa, amely ne rendelkezne valamely PKC izoformával, illetve izoformákkal. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy nem mindegyik izoenzim található meg minden sejttípusban; azaz a PKC izoenzimek a szervezetben az adott speciesre, szövetre, valamint sejtre jellemző megoszlást és mintázatot hoznak létre (251,252,254-256).

Ezen megoszlás gazdagságából fakad, hogy a PKC enzimek az élettani szabályozó folyamatok legszélesebb skáláját képesek befolyásolni. Alapvető és központi szereppel bírnak például a sejtek proliferációjának és differenciálódásának szabályozásában, a programozott sejthalál folyamatsorában, a meghatározott sejttípusok által termelt mediátorok (vazoaktív anyagok, növekedési faktorok, citokinek) szintézisében, ingerlékeny szövetek elektrofiziológiai jellegzetességeinek (csatorna-aktivitás, akciós potenciál kódolás, izomkontrakció) optimális kialakításában, a központi idegrendszer integritásának és működésének fenntartásában, a szervezet védekező mechanizmusában (fagocitózis, immunglobulin termelés), stb (257).

Az utóbbi időben egyre több bizonyíték szól amellett, hogy a PKC izoenzimek nemcsak szerkezeti, aktivációs és megoszlási heterogenitást mutatnak, hanem regulációjuk és biológiai szerepük is jelentősen különbözik egymástól (252,257). Bebizonyosodott emellett az is, hogy egy adott sejtválasz (különös tekintettel a proliferáció és differenciálódás) kialakításában a különböző izoenzimek nemcsak eltérő aktivitással vehetnek részt, de hatásuk gyakran ellentétesnek adódik.

II.4.4. A PKC izoenzimek és az adhéziós molekulák kapcsolata

Az irodalomban nagyon kevés adat található arról, hogy a PKC rendszer résztvesz-e az adhéziós molekulák kifejeződésének szabályozásában. Ennek kiderítése érdekében korábban PKC inhibitorokat és aktivátorokat alkalmaztak. Az eredmények szerint a szelektív PKC inhibitor H7, illetve tirozin- és szerin/treonin kináz gátló staurosporin alkalmazásával a calcium-függő dezmoszómák kialakulása gátolható volt, ami valószínűsíti, hogy a PKC szerepet játszhat a dezmoszómák kialakulásában (258). Ugyancsak vizsgálták az általános PKC aktivátor TPA (12-O-tetradekanoil-phorbol-13-acetát) hatását. Eszerint 15 perccel a TPA kezelés után elektronmikroszkóppal vizsgálva sejt-sejt kontaktusok alakultak ki adherens junkciókon keresztül (258). Teljes mértékben hiányzik ugyanakkor annak leírása, hogy az egyes PKC izoformák milyen mértékben és hogyan szabályozzák az adhéziós molekulák kifejeződését.

II.5. Poliszisztémás autoimmun kórképek

II.5.1. A szisztémás lupus erythematosus epidemiológiája és patogenezeise

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) poliszisztémás autoimmun betegség, mely a bőr és valamennyi belső szerv gyulladásos elváltozásával járhat. Az első klinikai tünetek általában a 3-4. életévükhöz lépnek fel. Elsősorban a fogamzóképes nők érintettek, férfi:nő arány mintegy 1:9 az össz populációban (259). A betegség prevalenciája 5-50/100 000 lakos. Az SLE etiológiáját tekintve multifaktoriális betegség, kialakulásában a genetikai predispozíciónak, endogén és exogén faktoroknak egyaránt szerepe lehet, de a pontos kiváltó tényező még ismeretlen. Az SLE genetikai meghatározottságát egyrészt a HLA (B8, DR2, DR3) asszociáció, másrészt a családi halmozódás bizonyítja, bár maga a betegség nem tekinthető örökletesnek. Ismert az a tény is, hogy tünetmentes családtagokban nem patogén autoantitestek sokkal gyakrabban mutathatók ki, mint a kontroll csoportban. A legfontosabb endogén provokáló tényező az ösztrogén, de a stressz is elősegítheti a tünetek megjelenését. A környezeti hatások közül az UV sugárzás (napfény, szolárium), a fertőzések, elsősorban vírus fertőzések, az orális antikontraceptívumok és bizonyos gyógyszerek (hydralazin, isoniazid, procainamid) induktív hatását mutatták ki (260).

A patomechanizmusban elsősorban az immunrendszer humorális tényezőinek van szerepe. A poliklonális B sejt aktiváció fokozott antitesttermelést vált ki mind a saját, mind a nem saját antigénekkal szemben. A B sejt hiperaktivitást okozhatja a B sejtek defektusa, Th sejtek okozta extrém stimuláció vagy regulatív sejtek defektusa. E folyamat immunkomplex

felhalmozódáshoz vezet, melyet az eliminálásukért felelős mechanizmusok károsodása tovább súlyosbíthat. Az immunkomplexek a szövetekben lerakódva szervi károsodásokhoz vezetnek. Az SLE az egyik legismertebb immunkomplex betegség. Az autoantitestek egy része jellegzetesen sejtmag alkotórészek ellen irányul, mint az immunfluoreszcens módszerrel kimutatható antinukleáris antitestek (ANA) és a kettősszájú DNS elleni antitestek. Bizonyos ellenanyagok azonban önmagukban, immunkomplex képzés nélkül is patogének lehetnek, mint például a sejtfelszíni struktúrák vagy a foszfolipidek elleni antitestek. A gyulladás és szövetdestrukció gyakorlatilag minden szervben bekövetkezhet, ezért az SLE igen változatos klinikai képpel jár.

II.5.2. A szisztémás lupus erythematosus klinikuma

Az SLE klinikai tünetei igen változatosak lehetnek az érintett szervrendszerek és a lefolyás súlyosságának függvényében. A megbetegedettek 95%-ánál jelentkeznek általános tünetek, úgy mint láz, testsúlycsökkenés, fáradékonyság, rossz közérzet. A leggyakrabban érintett szervek és szervrendszerek a bőr, mozgásszervek, savós hártyák, érrendszer, vese, légzőrendszer, idegrendszer és gasztrointesztinális rendszer. A betegség ritkán jelentkezik a klasszikus tünetek teljes repertoárjával. Általában lappangva kezdődik, a kritériumtünetek fokozatosan alakulnak ki és a diagnózis sokáig nem egyértelmű, mivel más típusú autoimmun kórképek is járhatnak hasonló tünetekkel. A kezdeti tünetek között leggyakrabban a rossz általános állapot (láz, gyengeség, fáradékonyság, testsúlyvesztés, hajhullás), az ízületi-, és izomfájdalmak, a savós hártyák gyulladásai valamint laboratóriumi eltérések fordulnak elő (gyorsult vörösvértest süllyedés, autoantitestek megjelenése) (259). Az SLE diagnosztizálása nemzetközileg elfogadott egységes kritériumrendszer alapján történik (ACR, 1997) (260). Az SLE diagnózisa megállapítható, ha egy időben vagy a betegség folyamán legalább 4 kritérium jelen van. Az autoimmun betegségek aktivitásának megítélését különböző pontrendszerek segítik, melyek a betegségek eltérő súlyossági fokú tüneteinek számokat rendelnek és azok összege jellemzi a beteg aktuális állapotát. Az SLE aktivitását megbecsülő pontrendszerek a SLEDAI (SLE Disease Activity Index), ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure) és a SLAM (systemic lupus Activity Measure). Az aktivitás a betegség egy konkrét időszakára vonatkozik, így a kórlefordulás során változhat. A kórlefordulás egészét a súlyosság meghatározásával jellemezhetjük, mely a maradandó szervkárosodásokat értékeli hasonló pontrendszerek révén (Damage Index).

II.5.3. Autoantitestek szisztémás lupus erythematosusban

Az SLE számos laboratóriumi eltéréssel jár, melyek egy része általános gyulladásos jel, más része pedig, a betegségre jellemző immunológiai lelet. Nem specifikus aktivitási jel a gyorsult vörösvértest sülyyedési sebesség, az anémia, az emelkedett C-reaktív protein szint, az emelkedett α_2 - γ -globulin szint, a hipokomplementémia. Esetleg autoantitestek által kiváltott citopénia lehet a leukocitopénia ($<4000/\mu\text{l}$), a limfocitopénia ($<1500/\mu\text{l}$), a thrombocitopénia ($<100\ 000/\mu\text{l}$), illetve anaemia (Hgb $<10\text{g/l}$). A betegek szérumában különféle autoantitestek vannak jelen, melyek összefüggést mutatnak bizonyos klinikai tünetek megjelenésével, és szintjük a kórlefolyással korrelál (4. táblázat). Az egyes ellenanyagok szérumból történő kimutatása hozzásegít a kórkép helyes diagnosztizálásához és lehetővé teszi más autoimmun patogenezisű szisztémás betegségektől való elkülönítését.

| ANF | anti-ds-DNS | anti-Sm | anti-RNP | anti-SS-A | anti-SS-B | anti-CL | RF | anti-hisztón |
|---|-------------|---------|----------|-----------|-----------|---------|-----|--------------|
| 95% | 90% | 30% | 30% | 40% | 25% | 25% | 30% | 30% |
| ANF - antinukleáris faktor; anti-ds-DNS - kettősszálú DNS elleni antitest; anti-RNP - ribonukleoprotein elleni antitest; anti-CL - kardioplipin elleni antitest; RF - reumafaktor | | | | | | | | |

4. táblázat: Az SLE-ben leggyakrabban előforduló autoantitestek és előfordulási gyakoriságuk.

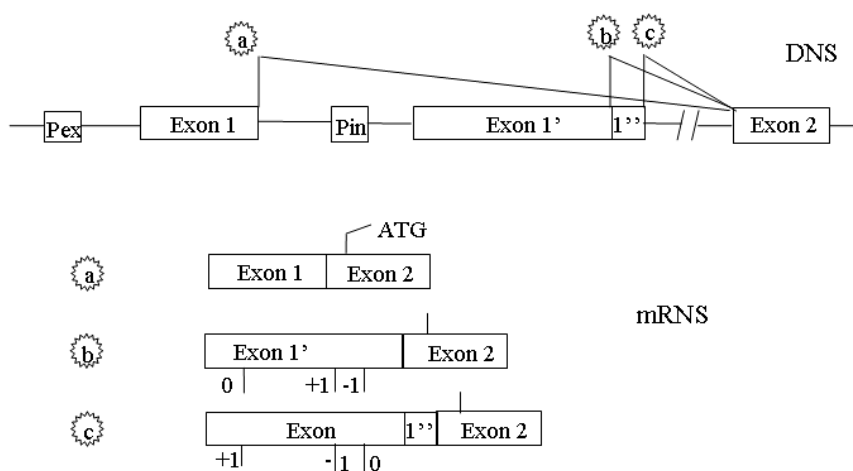
II.5.4. Az anti-Ro/SS-A és anti-La/SS-B autoantitestek

Először 1969-ben Clark és mtsai mutatták ki humán szöveti extraktumban immundiffúziós módszerrel egy új antigén, a Ro/SS-A (továbbiakban Ro) ellen termelődő autoantitestek jelenlétét SLE-ben és Sjögren szindrómában szenvedő betegek szérumában (261). Azóta ismertté vált, hogy a Ro/SS-A és a vele gyakran együtt előforduló La/SS-B (továbbiakban La) autoantigének ellen termelődő autoantitestek az autoimmun betegségek egy csoportjára igen nagy gyakorisággal jellemzők. Ide sorolható a neonatális lupus erythematosus (NLE), primer Sjögren szindróma (pSS), a subacut cutan lupus erythematosus (SCLE), az ANA negatív SLE és a homozigóta C2,C4 deficienciához társuló SLE (262).

A Ro és La antigének egymáshoz hasonlóan ribonukleoprotein komplex elemei, amelyben a fehérjék kismolsúlyú citoplazmatikus RNS-hez nem kovalens módon kapcsolódnak (263). Az elmúlt évtizedben 3 gént azonosítottak, melyek a Ro fehérje komponenseit kódolják (262). Először Deutscher és mtsai írták le a Ro 60 kD-os polipeptid alkotóját, majd később ismertté váltak a 46 és az 52 kD-os formák is (264-267). Aminósav sorrendjük meglehetősen különböző, a 46 kD-os forma homológna bizonyult a kalretikulinnal, mely egy calcium kötő fehérje és elsősorban az endoplazmatikus

retikulumban található (268). A 46 és 60 kD-os formák idegen fehérjékkel mutatnak bizonyos fokú homológiát, ami felveti a lehetőségét annak, hogy idegen fehérjék ellen induló immunreakciók később „epitóp spreading” révén saját struktúráját támadva autoimmun választ provokálhatnak (269).

Az La esetében egyetlen 46-50 kD-os protein lánc kötődik a kis molekulású citoplazmatikus RNS-ekhez és feltételezhetően szerepe van ezen RNS molekulák szintézisében, érésében és szállításában (263). Sjögren szindrómás betegek limfocitáin leírták, hogy az La antigénnek több formája van, amelyek az RNS alternatív vágásának következtében jönnek létre (270,271). Az 5. ábra mutatja az La fehérje N terminálisát kódoló mRNS szerkezetét és keletkezését az alternatív vágás során.



5. ábra: Az La autoantigén három különböző mRNS formája. A 3 forma keletkezési folyamatának vázlatos bemutatása az alternatív mRNS vágás során, valamint a 3 mRNS szerkezetének szemléltetése az 5' terminálisnál. a = exon 1 forma; b = exon 1' forma; c = exon 1'' forma. A fehérjekódoló szakasz kezdő ATG-jét (exon 2) és a többi lehetséges kezdő ATG-eket bejelöltük. A +, - és 0 jelek a 2-es exon ATG-jéhez viszonyított pozícióeltéréseket jelölik.

Míg a Ro antigének a sejtmagban és a citoplazmában is, az La antigének elsősorban a sejtmagban lokalizálódnak, noha az La kivándorolhat a citoplazmába. Ultraibolya B (UVB) besugárzás, ösztrogén kezelés és bizonyos vírusok hatására a Ro és La antigének transzlokálódhatnak a sejtfelszínre, ahol kapcsolódhatnak hozzájuk a keringő anti-Ro és anti-La autoantitestek (272-276).

II.5.5. A szisztémás lupus erythematosus kezelése

Az SLE a többi autoimmun betegséghez hasonlóan olyan kórkép, melyet jelenleg az orvostudomány – a gyógyszerindukált esetek egy részének kivételével- nem tud véglegesen gyógyítani. Az SLE kezelése a betegség aktivitásától valamint a beteg tüneteinek

súlyosságától függ. A betegek többnyire komplex terápiát igényelnek, mely a provokáló tényezők kerülését illetve eliminálását, szükség szerint kortikoszteroid, nem szteroid gyulladáscsökkentő, immunszuppresszív és immunmoduláns szerek alkalmazását, valamint szupportív terápiát foglal magába (5. táblázat).

| | |
|----|--|
| 1. | <u>Általános eljárások</u> |
| a) | provokáló gyógyszer elhagyása |
| b) | UV-sugárzás kerülése |
| c) | lokálisan fényvédők alkalmazása |
| d) | fertőzések kerülése ill. adekvát antibiotikus terápia |
| 2. | <u>Gyógyszeres kezelés</u> |
| a) | nem szteroid típusú gyulladásgátlók |
| b) | antimaláriás szerek |
| c) | kortikoszteroidok |
| d) | immunszuppresszív citosztatikumok |
| e) | egyéb immunmoduláns szerek és újabb immunszuppresszív készítmények |
| f) | biológiai készítmények |
| 3. | <u>Szupportív terápia</u> (művesekezelés, antihipertenzív szerek, antiepileptikumok, antikoagulánsok) |
| 4. | <u>Egyéb eljárások</u> (plazmaferézis, IVIG, vesetranszplantáció) |

5. táblázat: Az SLE kezelésének sematikus vázlata.

Az SLE a megbetegedettek egész későbbi életét végigkíséri, tehát minden olyan új eljárás, mely a betegek tüneteit enyhíti, nagy jelentőséggel bír az életminőség alakulásának szempontjából. Egy ilyen új terápiás lehetőséget jelent az SLE-s betegek UVA1 fénykezelése. Az ultraibolya sugárzás elektromágneses sugárzás, melynek hullámhossz-tartománya a röntgen sugárzás és a látható fény spektruma között helyezkedik el. Az ultraibolya sugártartományon belül UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) valamint UVA (320-400 nm) sugárzást különböztetünk meg. Az UVA sugártartomány tovább osztható UVA1 (340-400 nm) illetve UVA2 (320-340 nm) tartományokra. Az UVA2-t funkcionális szempontból ma már az UVB sugárzás kiterjesztésének tartják (277,278).

Míg az UVC sugárzás egyértelműen káros az emberi szervezetre, addig az UVB és UVA sugárzás alkalmazása fénykezelés formájában már több bőrgyógyászati kórkép terápiájában létjogosultságot nyert. Az utóbbi évtized során felzárkózott hozzájuk a szelektív UVA1 sugárzással végzett fototerápia, melyet az AD, a cutan T-sejtes lymphoma, a lokalizált scleroderma és a szisztémás sclerosis eseteiben sikerrel alkalmaztak (279-282). Az AD-ben szenvedő betegek UVA1 terápiája során a klinikai tünetek súlyosságát jellemző pontszám, a szérum ECP szintje és a vér eozinofil sejt száma szignifikánsan csökkent, ami az eljárás

hatékonyságát jelzi e betegcsoport akut, súlyos fellángolásának kezelésében (279). Az UVA1 terápia hatékonysága ebben a betegcsoportban felülmúlta a hagyományos UVA-UVB fénykezelés eredményességét és legalább olyan sikeres volt, mint az erős lokális kortikoszteroid terápia. Hasonlóan sikeresnek bizonyult az UVA1 fototerápia a szisztémás sclerosis bőrtüneteinek kezelésében, ahol a klinikai állapot javulását az ízületek passzív mozgástartományának, a bőr hőmérsékletének és elaszticitásának szignifikáns növekedése jelezte (282).

Az UVA1 terápia hatékonyságát az SLE kórképben először a betegség állatkísérletes modelljén tanulmányozták, ahol a fénykezelés hatására az állatok túlélésének meghosszabbodását tapasztalták, melyhez a DNS elleni autoantitestek szintjének csökkenése és a sejthez kötött immunválasz javulása társult (283). Ezt követően McGrath és munkacsoportja valamint Polderman és mtsai számoltak be közleményeikben a klinikai tünetek szignifikáns javulásáról, melyet az autoantitestek titerének csökkenése kísért (284-287). Az UVA1 terápia SLE-s betegekre gyakorolt jótékony hatásairól szóló irodalmi adatok tehát rendkívül biztatóak, eddig azonban ebben a betegpopulációban csak két kutatócsoport végzett ilyen kezelést. Nem ismertek olyan jellegű immunológiai vizsgálatok, melyek az UVA1 terápia SLE-ben megfigyelhető kedvező hatásainak hátterében lévő immunológiai változásokról számolnának be.

II.5.6. A polymyositis és a dermatomyositis patogenezise

A polymyositis (PM) és a dermatomyositis (DM) ritka szisztémás autoimmun megbetegedések, amelyek a vázizmok gyengeségével, gyulladásos beszűrődésével járnak. A legjellegzetesebb tünet a mindig jelen lévő, elsősorban a proximális végtagizmokat érintő izomgyengeség, ami a betegeket napi rutin tevékenységükben (fésülködés, borotválkozás, lépcsőn járás) akadályozza. DM-ben jellegzetes bőrtünetek észlelhetők, ilyenek a felső szemhéjat érintő heliotróp rash, vörös erythema az arcon, a nyakon, illetve a ruhakivágásnak megfelelően, valamint az ízületek fesztő felszínén megjelenő Gottron-jel. Az érintett izomból vett biopsziás minta szövettani képe a két betegségben eltérő. PM-ben a gyulladásos infiltrátum a fasciculákon belül helyezkedik el, a gyulladásos sejtek többsége CD8⁺ Tc sejt, amely sejtek effektor funkciót töltenek be. Jelenleg még nem azonosított izomantigén vagy antigének ellen kialakuló Tc sejtek közreműködésével létrejövő, perforin és/vagy Fas-Fas ligand utak által mediált miocitotoxicitás vezet a klinikai tünetekhez. DM-ben a gyulladásos infiltráció perifasciculáris, a Tc sejtek száma kevesebb, a Th sejtek, valamint a B sejtek dominálják a képet. Ebben az esetben csökken a CD8⁺ T sejtek közvetlen izomkárosító hatása

és előtérbe kerülnek a humorális immunológiai effektor mechanizmusok, melyek elsődleges autoantigénje az endomysialis erek endothelioma. A képződő antitestek, immunkomplexek és a kialakuló C5b-9 membranolitikus attack komplexek (MAC) a kapillárisok károsodásához, szöveti oxigén hiányhoz és következményesen izomrost károsodáshoz vezetnek (259,288,289).

II.5.7. Citokin vizsgálatok polymyositisben és dermatomyositisben

DM-ben és PM-ben kevés a citokin hálózatot kutató publikált kísérletes munkák száma, dominálón az érintett izmok immunhisztokémiai vizsgálatával nyert citokin eltérésekről számol be az irodalom. Mindenképpen ki kell emelni Lundberg és mtsai közleményeit. Egyik tanulmányukban öt DM-ben, öt PM-ben és öt IBM-ben (inclusion body myositis) szenvedő beteg izombiopsziáiban vizsgálták immunhisztokémiai módszerrel 16 különböző citokin jelentőségét (290). Szemben az egészséges kontrollokból nyert mintákkal, minden egyes betegmintánál találtak IL-1 α pozitivitást az izomban lévő erek endothel sejtjeiben, a mononukleáris inflammatorikus sejtekben valamint ezen sejtek környezetében. IL-1 β -t az érfalakban nem, de a minták többségében az inflammatorikus sejtekben sikerült kimutatni. A TGF- β 1-2-3 citokinek – bár különböző helyeken -, de jelentős pozitivitást mutattak minden beteg izombiopsziájában. Az IFN- γ -t hat, az IL-10-t öt esetben mutatták ki, míg IL-4 egyetlen mintában sem volt detektálható.

Ugyanez a munkacsoport 7 PM-ben és 4 DM-ben szenvedő beteg izombiopsziáiban vizsgálta az IL-1 α és IL-1 β expressziójának kezelés hatására történő változását immunhisztokémiai módszerrel. Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy 30-60 mg/nap kortikoszteroid kezelés hatására a betegek izombiopsziáiban a kezelés után 3-6 hónappal mindkét vizsgált citokin expressziója csökkent, bár a kapillárisok falában az IL-1 α expresszió továbbra is jelen volt (291). Kimutatták továbbá, szintén immunhisztokémiai módszerrel, az IL-1 α jelenlétét a gyulladt izomszövet kapillárisaiban, az erek endothel sejtjeiben (292). A munkacsoport egyértelműen amellett foglalt állást, hogy PM/DM-ben elsősorban az IL-1 α játszhat szerepet az izomtünetek kialakulásában, és az új terápiás lehetőségek egyik target molekulájaként is az IL-1 α -t jelölték meg. A kapott eredmények alapján a két betegséget azonos patomechanizmusúnak véleményezték (293).

Más munkacsoportok is igazolták PM/DM-ban szenvedő betegek izombiopsziáiban immunhisztokémiával a TNF- α , IL-1 β valamint immunhisztokémiával és in situ hibridizációval a TNF- α és receptorának jelenlétét (294,295). Fagyasztott izommetszeten RT-PCR-ral és immunhisztokémiával IFN- γ jelenlétét igazolták az érintett izmokban (296).

Detektálták továbbá a biológiai hatásában IL-2-höz hasonló IL-15 mRNS-ét, illetve intracitoplazmatikusan elhelyezkedő proteinjét PM/DM-ben szenvedő beteg izomsejt kultúrájában. Kimutatták, hogy a sejtek folyamatosan termelték az IL-15-t, de IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , TNF- α vagy LPS stimuláció hatására az IL-15 termelés dózis dependens módon fokozódott (297)

A perifériás vér citokinprofiljáról még kevesebb az irodalmi adat. 1996-ban Hagiwara és mtsai ELISPOT technikával PM-ben és DM-ben az IFN- γ termelő sejtek számának csökkenését, valamint csak PM-ben az IL-10 termelő sejtek számának emelkedését írták le. A PM és DM összevetése kapcsán azt tapasztalták, hogy DM-ben csökkent az IL-2 termelő, míg emelkedett az IL-6 termelő sejtek száma. Aktivitásfüggést csak az IFN- γ + sejtekkel kapcsolatban tudtak kimutatni (298).

III. Célkitűzések

III.1. Atopiás dermatitis

I/A. Az irodalmi adatok megoszlanak azzal kapcsolatban, hogy AD-ben a perifériás vérben megfigyelhető Th2 dominancia mely citokinek (IL-4 és/vagy IL-13) fokozott termelése révén jön létre. Elsőként a perifériás vér T sejtek citokin termelésének vizsgálatát és a szérumban oldható citokin szintek mérését tűztük ki célul.

I/B. Ezen vizsgálatok keretein belül szeretnénk volna adatokat nyerni az EAD és IAD betegcsoportok esetében is a perifériás T limfociták citokin termelésére vonatkozóan.

II/A. Nincs adat az irodalomban a perifériás vér fehérvérsejtek TLR-ainak vizsgálatáról AD-ben. Következő munkánk során a perifériás vér monociták, granulociták és limfociták sejtfelszíni TLR2, TLR4, CD14 és CD180 expressziójának, valamint a szérumban oldható CD14 (sCD14) szintjének mérését végeztük el.

II/B. Ugyancsak tanulmányoztuk a TLR-ok funkcióját a CD14 dependens LPS kötés és baktérium fagocitózis vizsgálatával.

II/C. A vizsgálat során összehasonlítottuk a TLR-ok számát és funkcióját az EAD és IAD csoportokban.

III.2. Psoriasis vulgaris és psoriasisos arthropathia

I/A. Elsőként arra kerestünk választ, hogy psoriasis vulgarisban szenvedő betegek perifériás vér T sejtjei, izolálás nélküli teljes vér festési technika alkalmazásával milyen citokin termelési mintázatot mutatnak.

I/B. Vizsgáltuk, hogy a CD4⁺ Th sejtek citokin mintázata megtalálható-e a CD8⁺ Tc sejtekben.

II/A. Célunk volt annak tanulmányozása, hogy PA-ben szenvedő betegekben alkalmazott szisztémás alphacalcidol kezelés eredményez-e változást a betegség klinikai paramétereiben a súlyossági indexek tükrében.

II/B. Választ kerestünk arra, hogy a szisztémás alphacalcidol kezelés hatására a klinikai paraméterekben létrejövő változások hátterében milyen immunológiai laboratóriumi eltérések állhatnak.

III.3. Krónikus urticaria

I/A. Mivel az irodalomban nem volt ismert adat a perifériás vér T sejtek citokin termeléséről KIU-ban, így elsőként ennek vizsgálatát tűztük ki célul a limfocita szubpopulációk meghatározásával párhuzamosan.

II/A. Célunk volt egy, az AIU diagnosztikájában alkalmazható, megbízható új funkcionális teszt kifejlesztése. Az aktivált bazofil sejteken de novo expresszáldó CD63 molekula sejtfelszíni kimutatására épülő sejtfestésen és áramlási citometria mérésen alapuló módszert, a bazofil aktivációs tesztet (BAT) állítottuk be az AIU diagnosztikájában.

II/B. A BAT használata során kapott eredményeket összevetettük az AIU diagnosztikájában alkalmazott másik két módszer, az ASST, valamint a „gold standard” HR teszt eredményeivel és vizsgáltuk az adatok korrelációját.

II/C. KIU-ban szenvedő betegek szérumában mértük az IgE, és eozinofil kationos protein (ECP) szinteket, majd kapcsolatot kerestünk ezen paraméterek és a CD63 expresszió között.

III/A. Ezt követően vizsgáltuk a CD63 BAT alkalmazhatóságát a klinikai gyakorlatban. A BAT pozitivitása alapján elkülönített AIU csoportot hasonlítottuk össze a FU és KIU csoportokkal az urticaria súlyosságát, kísérő betegségek előfordulását, autoantitestek kimutathatóságát és a beállított terápia hatékonyságát tekintve.

III.4. Adhéziós molekulák – Pemphigus

I/A. Célkitűzéseink között szerepelt immunhisztokémiai módszerrel annak vizsgálata, hogy az ismert dsz-ek közötti kompenzáció mellett ki tudunk-e mutatni együttműködést a dezmoszómális cadherine és a klasszikus cadherine között.

II/A. Az irodalomban számos alkalommal leírták, hogy az adhéziós molekulák sajátos eloszlást mutatnak az epidermisen belül. Nincs azonban ismeretünk arról, hogy ezen jellegzetes mintázat megfigyelhető-e modell keratinocita sejtvonal különböző differenciáltsági állapotaiban, vagyis a sejtek differenciáltsági állapotával összefügg-e az adhéziós molekulák expressziója.

II/B. Következő lépésként pedig azt vizsgáltuk, hogy ezen kapcsolómolekulák jellegzetes elhelyezkedése csupán a differenciáltság mértékétől függ-e, avagy különböző szabályozó mechanizmusok, így különféle kináz (pl. a PKC) rendszerek aktivitásától is.

III.5. Poliszisztémás autoimmun kórképek

I/A. Célul tűztük ki annak tanulmányozását, hogy a három Ro antigén mRNS-e és az La mRNS különböző hasítási formái expresszálódnak-e normál humán keratinocitákban és HaCaT sejtekben, valamint mértük a Ro és La mRNS formák expressziójának alap értékét ezekben a sejttypusokban.

I/B. Ezt követően két fontos provokáló ágens, az UVB sugárzás és az ösztrogén kezelés in vitro kifejtett hatását vizsgáltuk a különböző Ro és La mRNS-ek expressziójára. Ezáltal arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az UVB sugárzás és az ösztrogén kezelés milyen módon játszhat szerepet az autoimmun betegségek azon csoportjának provokálásában, ahol gyakori a Ro és La ellenes antitestek jelenléte.

II/A. Célunk volt vizsgálni az alacsony dózisú UVA1 fototerápia hatását SLE-ben szenvedő betegek klinikai tüneteire, valamint monitorozni a fényterápia során esetleg jelentkező nemkívánatos mellékhatásokat.

II/B. Ugyancsak elvégeztük az SLE-s betegek klinikai tüneteiben bekövetkező változások összevetését az immunológiai laboratóriumi paramétereik alakulásával UVA1 terápia után.

III/A. Vizsgáltuk, hogy DM és PM eltérő patomechanizmusának megfelelően kimutatható-e eltérő citokin mintázat a perifériás vérben és ez felhasználható-e a betegség aktivitásának követésére.

IV. Betegek és módszerek

IV.1. Betegek

IV.1.1. Atopiás dermatitis

A vizsgálatokban a Debreceni Egyetem OEC Bőrgyógyászati Klinikájának Allergológiai szakrendelésén gondozott AD-ben szenvedő betegek vettek részt. A diagnózist Hanifin és Rajka kritériumrendszere alapján állítottuk fel (299). A citokin meghatározások esetében 43 beteg (15 férfi, 28 nő, átlagéletkor: $13,6 \pm 7,0$ év, SCORAD (SCORE Atopic Dermatitis) átlaga $47,4 \pm 15,7$) heparinnal alvadásgátolt vérének és szérumát vizsgáltuk. A 30 egészséges kontroll a betegcsoporttal nemben és korban megegyező volt.

A TLR vizsgálatokban 30 beteg (18 férfi, 12 nő, átlagéletkor: $19,7 \pm 9,3$ év, SCORAD: $39,8 \pm 16,7$) és 56 kontroll személy vett részt. A vérvétel előtt négy hétig a betegek nem kaptak immunmoduláló szisztémás kezelést, és nem részesültek fényterápiában. Lokálisan alkalmazott kortikoszteroid tartalmú kenőcs és hidratáló externa alkalmazása nem volt kizáró tényező. A betegeket a szérum totál IgE és specifikus IgE értékei, valamint a prick teszt és atopy patch teszt eredményei alapján felosztottuk EAD-es és IAD-es csoportokra. A citokin vizsgálatok esetében 24 beteg, a TLR vizsgálatok esetében 20 beteg tartozott az EAD csoportba.

IV.1.2. Psoriasis vulgaris és psoriasis arthropathia

Citokin vizsgálatainkba 18 psoriasis vulgarisban szenvedő beteget vontunk be (14 férfi, 4 nő, átlagéletkor $47,2 \pm 17,6$ év volt). Valamennyien a Debreceni Egyetem OEC Bőrgyógyászati Klinikájának járóbeteg szakrendelésén megjelent közép-súlyos-súlyos psoriasisban szenvedő betegek voltak, akik bőrtüneteinek aktivitási indexének, a PASI-nak (psoriasis area severity index) átlaga $20,1 \pm 4,5$ volt. A betegek korábban lokális kortikoszteroid terápiában, UVB fototerápiában illetve Neotigason szisztémás kezelésben részesültek. A vérvétel előtt azonban legalább két hónapja nem kaptak fényterápiát, illetve szisztémás kezelést. Kontrollként 10 egészséges, nemben és korban megfelelő személyt vontunk be.

Az alphacalcidol klinikai és immunológiai hatásának tanulmányozása során 19 beteget vizsgáltunk, akik a Debreceni Egyetem OEC Bőrgyógyászati Klinikájának és a Kenézy Gyula Kórház Reumatológiai és Fizioterápiás Osztályának speciális szakrendeléseinek gondozása

alatt álltak. A vizsgálatba bevont 19 PA-ban szenvedő beteg közül a csont denzitometriás vizsgálat alapján 10 beteg az osteoporosis csoportba tartozott, ők részesültek alfacalcidol kezelésben (kezelt csoport) 6 hónapon át. A normál csont csontdenzitású csoport (9 beteg) képezte a kontroll csoportot. A kezelt csoportban 6 nő és 4 férfi beteg volt, az átlagos életkor $60,3 \pm 8,06$ év, a psoriasis fennállásának időtartama $15,2 \pm 10,54$ év, az ízületi tünetek fennállásáé pedig, $7,7 \pm 6$ év volt. A kontroll (normális csontdenzitású) csoportban 4 nő és 5 férfi beteg szerepelt $53 \pm 12,54$ év átlagos élettartammal, $21 \pm 8,49$ év átlagos psoriasis és $8,4 \pm 1,41$ arthritis fennállási idővel. A PA diagnózisát a Moll és Wright által 1973-ban leírt kritériumrendszer szerint állítottuk fel (300). A betegek vizsgálatban való részvételi szándékát -megfelelő felvilágosítást követően- beleegyező nyilatkozat aláírásával dokumentáltuk, etikai bizottság engedélyezte a vizsgálatot.

IV.1.3. Krónikus urticaria

A vizsgálatokba a Debreceni Egyetem OEC Bőrgyógyászati Klinika Allergológiai szakrendelésén gondozott krónikus urticariás betegeket vontunk be. A citokin meghatározás során 22 KIU beteget vizsgáltunk (4 férfi, 18 nő, átlagéletkor 40 év, szélsőértékek 11-76 év, bőrtünetek átlagos fennállási ideje 16 hónap).

A CD63 bazofil aktivációs teszt (BAT) beállításánál 30 KIU-ban szenvedő beteg (9 férfi, 21 nő, átlagéletkor 41,7 év, szélső értékek 13-74 év) szérumát használtuk fel.

A HR és a BAT korreláció vizsgálatában 72 KIU-ban szenvedő beteg vett részt (16 férfi, 56 nő, átlagéletkor 40,4 év, szélsőértékek 13-74 év, bőrtünetek átlagos fennállási ideje 8,4 hónap).

A klinikai vizsgálatokba 109 krónikus urticariás beteget vontunk be (27 férfi, 82 nő, átlagéletkor 39,8 év, szélsőértékek 13-74 év, bőrtünetek átlagos fennállási ideje 24,7 hónap).

A citokin mérésekben, a BAT és HR vizsgálatokban KIU betegek vettek részt, mely betegcsoporton belül elkülönítettük az AIU csoportot. A FU-ban, urticaria vasculitisben, fokális infekcióban, gyógyszer vagy étel okozta intolerancia illetve pseudoallergiás reakcióban szenvedő betegeket kizártuk a vizsgálatból. Legalább 4 nappal a vérvétel előtt felfüggesztettük az antihisztaminok adását, illetve egy beteg sem részesült immunszuppresszív vagy kortikoszteroid terápiában. A BAT beállításánál minden esetben elvégeztük az ASST-et, a szérum IgE és ECP szintjének meghatározását. A BAT és HR teszt korrelációjának vizsgálata során valamennyi betegnél elvégeztük az ASST-et, a HR tesztet és a BAT-et. A klinikai vizsgálatokban KIU-ban, AIU-ban és FU-ban szenvedő betegek is részt vettek. Az AIU diagnózisát a BAT pozitivitása alapján, a FU diagnózisát provokációs tesztek

segítségével állítottuk fel. Kontrollként korban és nemben megfelelő egészséges, nem atopiás egyének szolgáltak. Ezen kívül bőrtünetekkel is rendelkező SLE-ben és DM-ben szenvedő betegek szérumát használtuk a BAT és a HR teszt vizsgálatoknál.

IV.1.4. Poliszisztémás autoimmun kórképek

Az UVA1 terápia hatását vizsgáló tanulmányban szereplő betegeket a III. sz. Belgyógyászati Klinika által gondozott SLE-s betegek közül választottuk ki. A kezelésben 9 beteg vett részt (8 nő:1 férfi, átlagéletkor 46,6 év, szélsőértékek 19-74 év, átlagos betegségstartam 9,3 év, szélsőértékek 3-16 év). A betegek korábbi klinikai tüneteit, autoantitest profiljukat és előzetes terápiájukat a 6. táblázat mutatja. A betegek vizsgálatban való részvételi szándékát -megfelelő felvilágosítást követően- beleegyező nyilatkozat aláíratásával dokumentáltuk, etikai bizottság engedélyezte a vizsgálatot.

50 PM-ben (37 nő, 13 férfi, átlagéletkor $45,9 \pm 13,7$ év) és 49 DM-ben (33 nő, 16 férfi, átlagéletkor $46,9 \pm 13,5$ év) szenvedő beteg vérmintáit vizsgáltuk. A betegeket a III. sz. Belgyógyászati Klinika járóbeteg szakrendelése gondozza. Diagnózisukat Boham és Peter kritériumrendszere alapján állítottuk fel (301). A referens kontrollok ($n=32$) nemben és korban megfelelő, autoimmun betegségben biztosan nem szenvedő, egészséges egyének voltak.

| | 1. beteg | 2. beteg | 3. beteg | 4. beteg | 5. beteg | 6. beteg | 7. beteg | 8. beteg | 9. beteg | átlag ± S.D. |
|--|--|---|---|---|---|---|---|--|---|--------------|
| Kor (év) | 74 | 23 | 46 | 53 | 67 | 57 | 19 | 52 | 28 | 46,6±19,4 |
| Betegség tartama (év) | 6.5 | 3 | 16 | 8 | 8 | 7 | 7.5 | 3 | 5 | 9,3±7,5 |
| Korábbi klinikai tünetek | fotoszenzitivitás, arthritis, pillangó erythema, mononeuritis multiplex, KCS, XO, panniculitis | leukopenia, thrombopenia, idegrendszeri érintettség, necrotizáló vasculitis, livedo reticularis, Raynaud-jelenség, billentyű elégtelenség, pulmonáris hypertensio | pillangó erythema, fotoszenzitivitás, polyarthritis KCS, Raynaud-jelenség, myositis, cutan vasculitis | fotoszenzitivitás, polyarthritis, leukopenia, pillangó erythema, Crohn betegség, Raynaud-jelenség, "lupoid hepatitis" | Discoid cutan lupus erythematodes, polyarthritis, fotoszenzitivitás, KCS, thyreoditis | polyarthritis, fotoszenzitivitás, leukopenia, pillangó erythema, pleuritis, alveolitis, KCS | polyarthritis, glomerulonephritis (WHO IV) | fotoszenzitivitás, polyarthritis, leukopenia, KCS, pulmonaris fibrosis, Raynaud-jelenség | fotoszenzitivitás, leukopenia, pillangó erythema, polyarthritis, glomerulonephritis (WHO I) | |
| Korábbi autoantitest pozitivitás | ANF, anti-ENA, anti-Sm | ANF, anti-ds DNS, anti-cardiolipin | ANF, anti-ENA, anti-Sm, anti-SS-A, anti-SS-B | ANF, anti-ds-DNS, anti-Sm, anti-SS-A, anti-SS-B, ACA, AMA | ANF, anti-Sm, RF | ANF, anti-SS-A, anti-SS-B | ANF, anti-ds-DNS, anti-Sm, anti-cardiolipin | ANF, anti-SS-A | ANF, anti-ds-DNA, anti-Sm, anti-SS-B | |
| Korábbi terápia | M | M, cyclosporin A | M, HY | M, HY, azathioprine | M, HY | M, IVC | M, methotrexat, HY, cyclosporin A | M, HY | M, HY | |
| Terápia a tanulmány kezdetekor | 8 mg M | 8 mg M | 8 mg M | 8 mg M | NSAID | 8 mg M + IVC | 4 mg M | NSAID | NSAID | |
| Autoantitest pozitivitás a tanulmány kezdetekor | ANF (homogén) | negatív | negatív | ANF (granuláris) | ANF (granuláris) | ANF (granuláris) | negatív | negatív | negatív | |

6. táblázat: Az UVA1 terápiában részesült SLE-s betegek adatai (KCS: keratoconjunctivitis sicca, XO: xerostomia, ACA: centromer ellenes antitest, AMA: mitokondrium ellenes antitest, M: metilprednisolon, IVC: i.v. cyclophosphamide, HY: delagil)

IV. 2. Módszerek – Klinikai protokollok

IV.2.1. Alphacalcidol kezelés hatásának vizsgálata során alkalmazott protokoll

A bevételi kritérium a sokízületi érintettséggel járó PA biztos diagnózisa volt. Kizárási kritérium volt a vesekövesség és az, ha felmerült egyéb gyulladásos arthropathia gyanúja. Minden beteg nem-szteroid gyulladásgátló (NSAID) kezelésben és stabil dózisú methotrexat kezelésben részesült a vizsgálat elkezdése előtt legalább 3 hónappal indítva, ezen a vizsgálat időtartama alatt nem változtattunk. Azon betegek, akiknek életkora 65 év felett volt vagy major gasztrointesztinális szövődményen (fekély, perforáció vagy vérzés) estek át vagy aktuálisan gasztrointesztinális panaszai voltak, nimesulid kezelést kaptak napi 2x100 mg adagban. A gasztrointesztinális panasz nélküli 65 év alatti betegek napi 2x75 mg diclofenac kezelésben részesültek.

A vizsgált betegcsoporton belül két csoportot képeztünk a csont denzitometriás vizsgálat eredménye alapján. Azok a betegek, akiknek csont denzitása a DEXA vizsgálat alapján az oszteopéniás tartományba esett (<-1 T score akár a gerinc akár a proximális femur területén mérve) az alphacalcidollal kezelt csoportba kerültek. Ezen csoportba tartozó betegeknek napi 2 x 0,25 µg alphacalcidol kezelést indítottunk az első vizit után. A normál csontdenzitású csoport képezte a kontroll csoportot. A betegek bőrtüneteinek helyi kezelését nem változtattuk meg a vizsgálat ideje alatt, valamennyi beteg kortikoszteroid tartalmú kenőcsöt alkalmazott.

IV.2.2. Alphacalcidol kezelés hatásának klinikai és laboratóriumi értékelése

A vizsgálat során 6 hónapos követési periódusban három vizitot végeztünk el: az első vizit induláskor történt, majd 3 és 6 hónap elteltével egy-egy újabb vizit következett. A vizit időablaka minden esetben ± 14 nap volt. Minden alkalommal rögzítettük a főbb klinikai paramétereket a PASI, a VAS (a beteg saját betegségének aktivitásáról alkotott véleménye 100 mm-es vizuális analóg skálán) és a DAS (a PA klinikai aktivitását vizsgáló, 28 ízületet tekintetbe vevő, 3 változós disease activity score) alapján (302).

Szintén minden vizit alkalmával történtek rutin laboratóriumi vizsgálatok (vörösvérsejt süllyedési sebesség /We/, szérum calcium, foszfor, urea, creatinin, vérékép, májfunkciók valamint a vizelet calcium/creatinin ürítés arányának meghatározása a reggeli első vizeletből) és immunológiai laboratóriumi vizsgálatok. Utóbbiak magukban foglalták a CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD19+ sejtpopulációk százalékos arányának meghatározását, az aktivált T

sejt arány mérését (HLA DR és CD69 pozitivitás), a monocita-makrofág sejtpopuláció vizsgálatát (CD14+/CD16+ és CD14+/CD16- sejtek) valamint a CD4+/CD25+ T sejtek detektálását. A meghatározás monoklonális antitestekkel történő festés és áramlási citometria segítségével a későbbiekben részletezett módon történt. A Th1/Th2 arány valamint a Tc1/ Tc2 arány számolását a CD4+ Th és CD8+ Tc sejtek intracelluláris citokinjeinek meghatározása (IFN- γ és IL-4) alapján, a szérum IFN- γ , IL-10 valamint IL-4 szintjének mérését pedig, ELISA módszerrel végeztük a lentebb ismertetettek szerint. Minden betegnél megtörtént a gerinc és a femur csont denzitometriás (DEXA) vizsgálata Lunar DPX Pro (Lunar Corporation 726 Heartland Trail Madison, WI 53717, USA) készülékkel, valamint a kéz és a láb összehasonlító Rtg vizsgálata is.

A vizsgálat primer végpontjai 3 illetve 6 hónap után az immunrendszer működésében laboratóriumi módszerekkel vizsgált és a klinikai paraméterekben (VAS, PASI, DAS28) észlelt változások voltak. A másodlagos végpontok a szérum calcium szintjében és a reggeli első vizeletben mért calcium/creatinin arány voltak szintén 3 és 6 hónap után.

IV.2.3. UVA1 terápia klinikai protokollja

A vizsgálatban 9 SLE-s beteg vett részt. A részvétel feltétele volt, hogy teljesítsék az SLE diagnosztikus kritériumait (ACR, 1997), több mint 6 hónapja álljon fenn enyhe vagy középsúlyos formájú betegségük és gyógyszeres kezelés mellett állapotuk stabil legyen. A betegválogatásnál figyelembe vett kizáró kritériumot jelentett az aktív, súlyos vagy gyorsan változó betegség, fotoszenzitivizáló gyógyszerek használata, UVA hiperszenzitivitás a fényteszt során, valamint súlyos kardiovaszkuláris kórkép az anamnézisben. Jelenlegi immunszuppresszív terápiájukon a kezelést megelőző 3 hónapon belül és a kezelés alatt nem változtattunk. A vizsgálat alatti terápiát és a kimutatható autoantitest pozitivitásokat a 6. táblázatban tüntettük fel. Valamennyi beteg Fitzpatrick 2-es bőrtípusba tartozott.

Az UVA1 fénykezelést 25 darab speciális UVA1 sugárzólámpával (Philips, TL 100W/10R) végeztük, melynek fő emissziós tartománya 340-450 nm, és az emissziós maximuma 365 nm-en van. A fototerápiát 60 kJ/m²/nap átlagos dózisu UVA1 sugárzással végeztük, mely a minimális erythema kiváltásához szükséges dózisnak körülbelül 1/6-a. Mivel az UVA1 lámpa 1 J/cm² sugárzást 40 másodperc alatt bocsát ki, ezért a napi fénykezelés 4 percet vett igénybe. A vizsgálatot a téli hónapokra időzítettük, hogy a természetes fénysugárzás járulékos hatását csökkentjük. A kezelés megkezdése előtt a betegeket fényteszttel vizsgáltuk az UVA hiperszenzitivitás kizárása céljából.

A fényterápia 9 hétig tartott, a betegek az első 3 hétben hetente 5-ször, a második 3 hétben 3-szor, végül 2-szer kaptak kezelést. Az UVA1 terápiát a terápiás dózis felével kezdtük el, és fokozatosan emelve a sugármennyiséget a második hétre értük el a 60 kJ/m²/nap dózist.

IV.2.4. UVA1 terápia hatékonyságának klinikai értékelése

A betegek klinikai tüneteit és laboratóriumi paramétereit a fototerápia megkezdése előtt és a 9. hét után vizsgáltuk. Az SLE klinikai aktivitását két módszerrel mértük. Alkalmaztuk a klinikai betegség aktivitási indexet, mely 10 klinikai paramétert monitoroz, melyeket ebben a betegcsoportban korábban kimondottan alkalmasnak találtak a terápia eredményességének megítélésére (284,278). Az egyes tüneteket 3 és 0 között pontoztuk attól függően, hogy azok súlyosak, közepesek, enyhék voltak vagy hiányoztak. A vizsgált tünetek: bőrtünetek, ízületi fájdalom, aktivitás csökkenés, alvászavar, rossz közérzet, fejfájás, stomatitis, fájdalomcsillapító gyógyszerek iránti igény. Továbbá a reggeli ízületi merevség fennállásának időtartama (0 = nem áll fenn; 1 = < 1 óráig; 2 = 1-3 óráig; 3 = > 3 óráig) és a fáradtság kezdete a reggeli felkelést követően (0 = > 12 órával; 1 = 8-12 órával; 2 = 4-8 órával; 3 = < 4 órával). A másik alkalmazott módszer az SLE klinikai aktivitásának követésére a fényterápiát megelőzően és azt követően felállított SLEDAI súlyszám volt (303).

A kezelés előtt és után Saalman Multitester készülékkel végzett minimális erythema dózis meghatározással vizsgáltuk a páciensek UVA és UVB fényérzékenységét. A fényteszt során a betegek gluteális régióját UVB illetve UVA sugárzással világítottuk meg kb. 3 cm átmérőjű körökben eltérő dózisokkal. Másnap történt az eredmények leolvasása. Míg a fényérzékeny betegeknél bőrpír jelentkezett a besugárzás helyén, addig az adott hullámhossztartományra nem érzékenyeknél a megvilágítás helyén nem volt bőrelváltozás.

IV.2.5. UVA1 terápia hatékonyságának laboratóriumi értékelése

A laboratóriumi vizsgálatokat a 9 hetes UVA1 fototerápia előtt és a kezelés után végeztük el. A betegektől az első fototerápiás kezelés előtt és az utolsó kezelés után 24 órával vettünk vért steril heparinos csövekbe. A mintákat a vértvételt követően 2 órán belül feldolgoztuk.

A teljes komplement aktivitást és az immunkomplex szinteket passzív hemagglutinációval, a komplement 3 (C3), C4 és az immunglobulinok (IgG, IgA, IgM) szintjét pedig nefelometriával határoztuk meg.

Az ENA (Sm, Sm/RNP, SS-A, SS-B), ds DNS, cardiolipin (CL), és a β_2 - glikoprotein I elleni autoantitesteket ELISA (Hycor Biomedical, UK) technikával mértük. Az ANF-t indirekt immunfluoreszcenciával (IIF), HEp-2 sejteket felhasználva határoztuk meg. A teszt eredményét 1:200 illetve e feletti hígítás esetén tekintettük pozitívnak. Az ANCA szinteket szintén IIF-val detektáltuk szeparált granulociták felhasználásával.

A sejtfelszíni CD markerek (CD3, CD4, CD8, CD19) meghatározásához fluoreszcens festékekkel konjugáltatott monoklonális ellenanyagokat használtunk a későbbiekben részletezett módon.

Az intracelluláris citokinek (IFN- γ , IL-4) festését heparinnal alvadásgátolt vérből végeztük a Becton Dickinson „Intracellular Staining Procedure” utasításai szerint a később részletezett módszerrel.

IV.2.6. Kérdőív és urticaria score felállítása

A 109 krónikus urticariás beteg egy nemzetközileg is elfogadott kérdőívet töltött ki, melyet M. Kozel bocsátott rendelkezésünkre (Department of Dermatology of the Academic Medical Center, University of Amsterdam) (304). A betegség súlyosságának megállapítására a Breneman és mtsai által közölt urticaria score-t alkalmaztunk kisebb módosításokkal, hogy alkalmassá váljon az FU-s betegek értékelésére is (305, 7. táblázat).

| Csalánkiütés lokalizációja | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| Nincs = 0 pont | 1 testrészen = 1 pont | 2-3 testrészen = 2 pont | kiterjedt urtica = 3 pont |
| Csalánkiütések fennállási ideje | | | |
| Nincs = 0 pont | <60 perc = 1 pont | 1-4 óra = 2 pont | >4 óra = 3 pont |
| Csalánkiütés mérete | | | |
| Nincs = 0 pont | 1-2 cm = 1 pont | 3-4 cm = 2 pont | >4 cm = 3 pont |
| Csalánkiütés gyakorisága | | | |
| Nincs = 0 pont | hetente 2x = 1 pont | hetente 3x = 2 pont | hetente 4-7x = 3 pont |
| Viszketés | | | |
| Nincs = 0 pont | Enyhe = 1 pont | Közepes = 2 pont | Súlyos = 3 pont |

7. táblázat: Az urticaria súlyosságának megítélésére használt módosított Breneman score.

IV.2.7. Krónikus urticaria kezelésénél alkalmazott terápiás protokoll

Valamennyi krónikus urticariás betegnél (109 beteg) első lépésként per os hisztamin receptor antagonistát alkalmaztunk. A betegek először alacsony szedatív hatású, második

generációs H1 receptor antagonistát kaptak (cetirizine 10mg), majd amennyiben a kezelésre nem reagáltak megfelelően ennek dózist emeltük (cetirizine 20mg), illetve kombináltan alkalmaztunk szedatív antihisztamint (hydroxyzine 2x25mg) és H2 receptor antagonistát (cimetidine 2x400mg). A terápiát eredménytelennek tekintettük amennyiben a súlyos szubjektív panaszok továbbra is fennálltak, vagy ha a totál urticaria score értéke kevesebb, mint 50%-kal csökkent. Második vonalbeli szerként rövid ideig per os kortikoszteroidot (methylprednisolone 32mg/nap, 5 naponta 4mg-mal csökkentve) alkalmaztunk a KIU és AIU betegek esetében. Ha az AIU betegeknél ez a kezelés is csak átmeneti javulást eredményezett, akkor 3. lépésként 3 hónapon át cyclosporin A kezelést alkalmaztunk 3 mg/kg/nap kezdő dózissal.

IV.2.8. Az autológ szérumbőrteszt

Az autológ szérumbőrteszt (ASST) a krónikus urticaria autoimmun alcsoportjának meghatározásában használt szűrő eljárásnak számít. A vénás vért olyan steril üvegcsőbe gyűjtöttük, mely nem tartalmazott alvadást elősegítő szert, majd ezt követően 30 percen keresztül hagytuk megalvadni szobahőmérsékleten. A szérumbot centrifugálással szeparáltuk 500g fordulatszámon 15 percig, majd steril körülmények között részekre osztottuk az ASST, a CD63 BAT és a bazofil HR teszt vizsgálatokhoz.

A beteg alkarjának hajlító felszínébe egyenként 50 µl autológ szérumbot, 10 µg/ml hisztamint és 0.9 %-os steril fiziológiás sóoldatot fecskendeztünk be 3-5 cm-es távolságokban, és a bőrelváltozás mértékét harminc perc múlva értékeltük. A vizsgálat akkor volt pozitívnak tekinthető, ha az injekciót követő 30. percben a szérumbot által kiváltott urtica vörös, és átmérője 1.5 mm-rel nagyobb volt, mint a fiziológiás sóoldatra adott bőrreakció.

IV. 3. Módszerek – Laboratóriumi technikák

IV.3.1. Limfocita és monocita szubpopulációk, valamint aktivált T sejtek arányának meghatározása

A limfocita és monocita szubpopulációk, valamint az aktivált T sejtek arányának meghatározását a sejtfelszíni CD markerek kimutatása alapján alvadástól teljes vérből, monoklonális ellenanyagok segítségével végeztük. Monoklonális ellenanyagok: anti-CD3-FITC (SIGMA 5 µl/minta), anti-CD56-PE (Becton Dickinson 10 µl/minta), anti-CD19-PerCP (Immunotech 2,5 µl/minta), anti-CD8-FITC (SIGMA 5 µl/minta), anti-CD4-PE (Immunotech

5 µl/minta), anti-CD3-FITC/HLA-DR-PE (Serotec 10 µl/minta), anti-CD69-CyChrome (Pharmingen 10 µl/minta), anti-CD14-PE (Immunotech 20µl/minta) és anti-CD16-FITC (Becton Dickinson 20 µl/minta).

A mintákat Coulter QPREP protokoll alapján dolgoztuk fel. A kiértékelés Coulter EPICS-XL-4 áramlási citométeren, System-II. 3.0 software segítségével történt. A limfocitákat, monocitákat és granulocitákat nagyságuk és granuláltságuk alapján választottuk el. 5000 sejtet értékeltünk az áramlási citométeren és - az 5000 sejtet 100%-nak tekintve - adtuk meg az adott antigén pozitivitása alapján a különböző szubpopulációk százalékos arányát.

IV.3.2. Intracitoplazmatikus citokinek meghatározása

A CD4+ és CD8+ sejtek intracitoplazmatikus citokin tartalmát heparinnal alvadásgátolt perifériás vérből határoztuk meg (306).

Mivel a nyugvó limfociták citokin tartalma alig detektálható, a perifériás vér 1 ml-ét tápfolyadékkal duplájára hígítottuk és a limfocitákat phorbol-myristate-acetate-tal (PMA, 25 ng/ml, SIGMA) és ionomycinnel (1 µg/ml, SIGMA) stimuláltuk 4 órán keresztül 5%-os CO₂ koncentráció mellett 37°C-os termosztátban. A *de novo* szintetizálódott citokinek kiürülését a Golgi készülékből Brefeldin-A-val gátoltuk (10 µg/ml, SIGMA). Az inkubációs idő letelte után a sejtfelszíni CD4 illetve CD8 molekulákat jelöltük monoklonális ellenanyagok segítségével (anti-human CD4 illetve CD8-Quantum Red, SIGMA, 10-10 µl) szobahőmérsékleten, sötétben, a stimulált vér 300 µl-ét használva, 30 perces inkubáció idővel. A vörösvérsejteket 20 percen keresztül desztillált vízzel 10x-re hígított lizáló oldat („Lysing Solution”, Becton Dickinson) 2 ml-jével lizáltuk és ezzel egyidőben fixáltuk a leukocitákat. Ezután egy mosási lépést követően a szintén desztillált vízzel 10x-re hígított permeabilizáló oldat („Permeabilizing Solution”, Becton Dickinson) 0,5 ml-jével permeabilizáltuk a sejtmembránokat. Egy újabb mosási lépés után monoklonális ellenanyagokkal jelöltük a Golgi készülékben lévő citokineket (izotípus kontroll: γ_{2a} -PE/ γ_{2b} -FITC, valamint anti-human IFN- γ -FITC/anti-human IL-4-PE, Becton Dickinson, 20 µl; anti-human IL-10-PE, Caltag, 10 µl; anti-human IL-13-PE, Becton Dickinson, 20 µl) 30 percig, szobahőmérsékleten, sötétben. A festési protokoll végén a sejteket 1%-os paraformaldehiddel fixáltuk. A mintákat mérésig +4°C-on hűtőszekrényben tartottuk.

A minták értékelése áramlási citométeren történt. A nagyság és granuláltság alapján a limfocitákat kapuval választottuk el a monocitáktól és granulocitáktól. Emellett a limfocitákon belül elválasztottuk a CD4+ vagy CD8+ sejteket a nem festődő sejtektől. A

CD4+ vagy CD8+ limfocitákból 5000 sejtet értékeltünk, ezeket 100%-nak tekintve százalékban adtuk meg a citokin pozitív sejtek arányát.

IV.3.4. Sejtfelszíni CD14, TLR2, TLR4 és CD180 expresszió vizsgálata

A fehérvérsejtek sejtfelszíni CD14, TLR2, TLR4 és CD180 számát specifikus antitestekkel, indirekt jelzéssel áramlási citometria segítségével határoztuk meg teljes vérből. 100 µl teljes vérben a fehérvérsejteket 10 µg/ml anti-CD14 26ic (Dr. Jos A. G. van Strijp, Dr. Kok P. M. van Kessel – Eijkman-Winkler Institute, Utrecht Egyetem, Hollandia), anti-CD180, anti-TLR4 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) és anti-TLR2 (Serotec, Raleigh, NC) monoklonális antitesttel illetve a megfelelő izotípus kontrollokkal (IgG1 – CD180, IgG2a – TLR2, TLR4, IgG2b – CD14, Serotec), majd ezt követően PE-kapcsolt kecske anti-egér IgG-vel (DAKO, Glostrup, Dánia) jelöltük meg. A vörösvérsejteket lizáltuk, a fehérvérsejteket fixáltuk. A mérést FACSCalibur (Becton-Dickinson) áramlási citométeren végeztük. A limfocitákat, monocitáktól és granulocitákat méretük és granuláltságuk alapján választottuk el egymástól. Az átlag FL2 fluoreszcencia intenzitást (MFI) a következőképpen határoztuk meg minden sejtcsoport esetében: a receptor specifikus monoklonális antitesteket tartalmazó minták MFI értékeiből kivontuk a megfelelő izotípus kontrollok („háttér”) MFI értékeit. A receptorok abszolút számának meghatározásához monoklonális antitest-kapcsolt standard gyöngyöket, „beadeket” (QIFIKIT, DAKO) alkalmaztunk (307). A módszer lényege, hogy a különböző, de ismert koncentrációjú CD5 monoklonális antitestekkel jelölt beadeket ugyanannyi ideig inkubáltuk az azonos mennyiségű PE-kapcsolt kecske anti-egér antitesttel, mint a sejtek jelölése során tettük. A mosást követően az FL2 fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük, a különböző beadek MFI értékeit pedig a monoklonális antitest/bead adott értékének függvényében ábrázoltuk logaritmikus skálán. Az így kapott standard görbe alapján a sejtek MFI értékéből meghatározható az egy sejten található monoklonális antitest kötőhelyek száma.

IV.3.5. CD14 függő LPS kötés meghatározása

A vizsgálathoz egy rendkívül hatékonyan jelölt bodipy-LPS készítményt használtunk és az LPS kötődését áramlási citometriával mértük. A betegektől és az egészséges kontrolloktól nyert Li-heparinnal alvadásgátolt vérmintákat kétszer mostuk, a leukocita sejtszámot 5×10^6 /ml-re állítottuk be. Annak érdekében, hogy megkülönböztessük a CD14 dependens és CD14 independens LPS kötet, a vérmintákat 30 percig +4 °C-on előinkubáltuk 10 µg/ml anti-CD14 blokkoló antitest (60bca, Dr. Jos A. G. van Strijp, Dr. Kok P. M. van

Kessel) jelenlétében vagy hiányában előinkubáltuk. Ezután 100 ng/ml bodipy-LPS-t (*S.minnesota*, Re595, Dr. Jos A. G. van Strijp, Dr. Kok P. M. van Kessel) adtunk a sejtekhez 4% normál humán szérum (NHS, 10 egészséges donorból összegyűjtve) jelenlétében. Ezt egy 30 perces 37°C-on történő inkubálás, a vörösvérsejtek lizálása és a fehérvérsejtek fixálása követte. A mérést FACSCalibur (Becton Dickinson) áramlási citométeren végeztük. Az anti-CD14 blokkoló antitest nélküli sejtek (teljes LPS kötés) fluoreszcencia intenzitásából kivontuk a blokkoló antitesttel inkubált sejtek fluoreszcencia intenzitását, így kaptuk meg a CD14 dependens LPS kötés mértékét.

IV.3.6. CD14 függő *E. coli* fagocitózis vizsgálata

A vizsgálathoz fluoreszcensen jelölt *E.coli*-bodipy készítményt használtunk és a sejtekhez kötött baktériumok mennyiségét áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A vérmintákat (EDTA-val alvadásgátolt) kétszer mostuk Ca^{2+} -mentes PBS-sel és a leukocita sejszámot $5 \times 10^6/\text{ml}$ -re állítottuk be. 50 μl hígított vért bodipy-kapcsolt *E. coli*-val (K-12, Molecular Probes, Eugene, OR; sejt: baktérium arány 1: 8) inkubáltunk 30 percig 37°C-on 10% EDTA plazma (10 egészséges donor normál plazmája) jelenlétében, majd a vörösvérsejteket lizáltuk és a fehérvérsejteket fixáltuk. Az FL1 fluoreszcencia intenzitást és a fagocitáló sejtek arányát FacsCalibur áramlási citométeren mértük le. Ugyancsak megmértük a baktériumok fluoreszcencia intenzitását és meghatároztuk az egy sejt által felvett baktériumok átlagát is („fagocitózis index”):

$$\text{fagocitáló sejtek \% -a} \times ((\text{MFI}^{\text{ph}} - \text{MFI}^{\text{nph}}) / \text{MFI}^{\text{b}}) / 100$$

ahol az MFI^{ph} , MFI^{nph} , MFI^{b} a fagocitáló és a nem fagocitáló sejtek, valamint a baktériumok átlag FL1 fluoreszcencia intenzitása.

IV.3.7. Donor sejtek a BAT és HR teszt vizsgálatokhoz

Két szenzitizált atopiás donor (D_{A1} , D_{A2}) és egy nem atopiás donor (D_{NA}) bazofil sejtjein végeztük a kísérleteket. Szérum IgE szintjük a következő volt: 842, 1464, 24 kU l^{-1} . Az atopiás donorjaink atopiás dermatitisben és allergiás rhinitisben szenvedtek. A vizsgálatok előtt egy héttel antihisztamin kezelés nem történt.

IV.3.8. A donor sejtek szeparálása és stimulálása

Az D_A és D_{NA} donorból származó, etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA) által antikoagulált, 24 ml teljes vért 6 % MacroDEXen ülepítettük 45 percig 37 °C-on. A fehérvérsejt frakciót

leszívtuk, majd hideg Hepes-EDTA pufferrel kétszer átmostuk. Ezt követően Ca^{2+} és Mg^{2+} iont tartalmazó HEPES pufferben reszuszpendáltuk a sejteinket ($10^7/\text{ml}$). Ezután 50 μl sejtet 50 μl krónikus urticariás szérummal (1:1-es, 1:5-ös és 1:10-es hígításban) vagy pufferrel inkubáltunk 40 percen át 37 °C-on. A reakciót jégfürdővel és 900 μl jéghideg Ca^{2+} -, Mg^{2+} - és BSA-mentes Hepes puffer hozzáadásával állítottuk le. Ezt követően a sejteket 5 percig centrifugáltuk 500g-n 4 °C-on. A sejtszuspenziót monoklonális antitestekkel festettük a CD63 BAT kivitelezéséhez (IV.3.9. pont). A felülúszót összegyűjtöttük, -70 °C-on tároltuk, majd elemeztük a hisztamin tartalmát (IV.3.10. pont).

A krónikus urticariás betegek szérumainak szűrése előtt a D_A és D_{NA} sejteinek reaktivitását a következő ágensekkel történő inkubációval vizsgáltuk: anti-humán IgE monoklonális antitest (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Clone: D ϵ 2, Immunotech, Marseille, Franciaország), FMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanin) (10^{-5} M, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Németország), anti-Fc ϵ RI α antitestet immunoblottal kimutathatóan tartalmazó krónikus urticariás szérum (1/2 végkoncentráció) és monocita kemotaktikus protein-1 (MCP-1, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Pharmingen OPTeia kit, San Diego, CA, USA).

IV.3.9. A bazofil aktivációs teszt – BAT

A krónikus urticariás szérumokkal előinkubált donor sejteket anti IgE-FITC és anti CD63-R-phycoeritrein (PE) konjugált monoklonális antitestekkel (mindkettő a Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA terméke) festettük 60 percen át 4 °C-on. A még jelen lévő vörösvértesteket lizáló reagens hozzáadásával lizáltuk. A sejteket átmostuk, majd az IgE és CD63 kettősen pozitív bazofil sejteket Becton Dickinson FACS Calibur áramlási citométerrel mértük. A méréshez beállítottunk egy FL1 küszöböt a számunkra érdektelen sejtek nagy részének eltávolítására, és kikapuztuk a fluoreszkáló, anti IgE-FITC-cel festődött sejteket. Az IgE-FITC és CD63-PE kettős pozitív sejteket az FL1-FL2 hisztogrammon határoztuk meg a megfelelő izotípuskontroll alkalmazásával. Mintánként legalább 500-1000 bazofilt mértünk az áramlási citofluoriméterrel.

A stimuláció nélküli alapérték megállapításához egy külön csőbe csak a puffert pipettáztuk be. Pozitívnak a negatív egészséges kontroll szérumok által indukált CD63 sejtszám + 2SD érték felett tekintettük az eredményt. (A különböző donor „cut off” értéke: D_{A1} : 7,1 %; D_{A2} : 12,3 %; D_{NA} : 5,1 %).

IV.3.10. A bazofil hisztamin felszabadulás mérése ELISA módszerrel (HR)

A krónikus urticariás szérumokkal előinkubált donor bazofil sejtek felülúszójából ELISA módszerrel végeztük el a hisztamin tartalom meghatározást a kitben (Immunotech, Marseille, France) szereplő útmutató alapján, duplikátumokban. A totál hisztamin meghatározáshoz 50 µl sejtszuszpenzióhoz 950 µl desztillált vizet pipettáztunk azért, hogy lizáljuk őket. A fagyasztás és olvasztás folyamatát kétszer megismételtük, így a sejtek lizálásával kinyertük a sejt teljes hisztamin tartalmát.

A módszer kompetíciós elven alapszik. A minták, kontrollok és standardok hisztamin tartalmát egy acilezési lépésben kémiai módon módosítottuk. Az így kapott acilezett hisztamin versengett a hisztamin-alkalikus foszfátáz konjugátummal a mikrolemez vályulatainak falához kitapasztott monoklonális antitesthez való kötődésért. Inkubálás után a mikrolemez mosása következett, és a kötődött enzimaktivitást kromogén szubsztrát hozzáadásával detektáltuk. A szín intenzitása fordítottan volt arányos a minták hisztamin tartalmával.

Az eljárás menete:

1. Acilezés: műanyag csövekbe 25 µl acilező puffert, 100 µl mintát, standardot vagy kontrollt és 25 µl acilező reagenst mértünk.
2. Immunológiai lépés: az anti-hisztamin tartalmú lemez vályulataiba 50 µl acilezett mintát, standardot vagy kontrollt mértünk és mindegyikhez 200 µl alkalikus foszfátázzal jelzett hisztamin konjugátumot adtunk. A mikrolemezt 2 órán át inkubáltuk 4 °C-on enyhe rázatás mellett, majd mosópufferrel háromszor mostuk.
3. Enzimreakció: a reakcióhelyekre 200 µl para-nitrofenil foszfát szubsztrát oldatot adtunk és a lemezt sötétben, rázás mellett 30 percig inkubáltuk. A reakciót 50 µl 1N NaOH hozzáadásával állítottuk le.
4. Fotometrázás: az abszorbanciát 405 nm-en ELISA reader-en (Labsystems Multiscan MS, Helsinki, Finnország) olvastuk le.

A vizsgálat kiértékelése:

Értékeléskor a spontán hisztamin felszabadulást levontuk. Az eredményeket a totál hisztamin tartalom százalékaként fejeztük ki. A spontán hisztamin felszabadulás kevesebb volt a totál hisztamin tartalom 5 %-ánál. A különböző donorok „cut-off” értékeit a 20 egészséges kontroll széruma által indukált hisztamin felszabadulás 95 percentiliseként határoztuk meg (D_A : 11,6 % és D_{NA} : 7,3 %).

IV.3.11. Szolubilis citokin koncentrációk meghatározása szérumban

A szolubilis citokin koncentrációk meghatározásáig a mintákat -70°C-on tartottuk. A keringő IL-4, IL-10, IL-13 és IFN- γ mennyiségi meghatározása a Pharmingen cég ELISA kitjeivel, a gyártók útmutatása alapján történt.

IV.3.12. Szolubilis CD14 mérése szérumban

A betegektől és a kontrolloktól vett szérumok szolubilis CD14 (sCD14) koncentrációját egy inhibíciós áramlási citometriás teszt segítségével határoztuk meg (308). A módszer lényege röviden, hogy $2,5 \times 10^5$ mononukleáris sejtet 10 μ l szérum mintával és 1 μ g/ml PE-kapcsolt anti-CD14 monoklonális antitesttel (MY4, Coulter, Hialeah, FL) inkubáltunk. A monocita-asszociált monoklonális antitest mennyiségét, mint átlag FL2 fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel határoztuk meg. Standard szérum hígítási sorát alkalmazva meghatároztuk a minták sCD14 koncentrációját.

IV.3.13. IgE szint meghatározása

A szérum IgE szintjét Behring Nephelometerrel határoztuk meg (magas:>100 kU l⁻¹).

IV.3.14. ECP szint mérése

A szérum ECP szintjének méréséhez a PHARMACIA CAP rendszert használtuk. (magas:>12 μ g/l).

IV.3.15. Autoantitestek meghatározása

A thyreoglobulin (a-TG), thyreoidea peroxidáz (a-TPO) és az extrahálható nucleáris antigén (a-ENA) antitestek szintjét ELISA (Hycor Biomedical GmbH, Kassel, Germany) segítségével mértük a gyártó ajánlásának megfelelően. Az endothelsejt ellenes antitest (AECA) szintjének meghatározását a szérumban szintén ELISA (Cogent Diagnostic, Edinburgh, UK) módszerrel végeztük a gyártó ajánlását követve (309).

IV.3.16. Immunhisztokémiai vizsgálat

A bőr biopsziás mintákat 12 pemphigus vulgarisban és 2 pemphigus foliaceusban szenvedő betegről a hólyag széléből nyertük. A diagnózist a jellegzetes klinikai kép és a hisztopatológiai eredmény alapján állítottuk fel.

A vizsgálatokat biotin-avidin-peroxidáz technikával végeztük (Streptavidin, biotinilált tormaperoxidáz és biotinilált anti-egér immunglobulinok, DAKO A/S, Dánia, P-cad elleni antitest – Transduction Laboratories, Lexington, KY, UK). A hő indukálta antigén feltárás során a paraffinba ágyazott, 4 µm-es metszeteket 2 percre előmelegített, 0,1 M-os, pH 6.0-s citrát pufferbe helyeztük. A nem specifikus háttér blokkolására normál nyúl szérumot alkalmaztunk. Az elsődleges antitesttel (1:50 hígítás) 4°C-on, egy éjszakán át nedves kamrában inkubáltuk a mintákat. A másodlagos antitest biotinilált anti-egér immunglobulin (1:400 hígítás) volt, kromogénként diaminobenzidint vagy etilcarbazolt használtunk. A metszeteket hematoxylinnal is festettük. Kontrollként normál perilezionális bőr szolgált. Ezek a minták intenzív P-cad immunreaktivitást mutattak a bazális keratinociták sejt-sejt kapcsolódásainál.

IV.3.17. Sejttenyésztés

Rekombináns transzfekció segítségével korábban a Debreceni Egyetem OEC Élettani Intézetében olyan HaCaT sejteket hoztak létre, amelyek egyes PKC izoenzimeket (illetve kontrollként az „üres”, azaz PKC-specifikus cDNS-t nem tartalmazó vektort) stabilan overexpresszálnak (310). Megvizsgálva ezen sejtek viselkedését a tenyésztés során kimutatták, hogy az nPKCε-t vagy a cPKCβ-t fokozottan expresszáló sejtek növekedési üteme felgyorsult, míg a cPKCα-t vagy az nPKCδ-t kifejezőkben a proliferáció lecsökkent a kontroll (azaz az „üres” vektort overexpresszáló) sejtekhez képest. Megvizsgálták továbbá, hogy az egyes izoenzimeket túltermelő sejtek milyen differenciáltsági állapottal jellemezhetők. Megállapították, hogy a hiperproliferatív cPKCβ-t vagy nPKCε-t overexpresszáló sejtekben lecsökkent a késői differenciáltsági markerek szintje, szemben a cPKCα-t és δ-t expresszáló hipoproliferatív keratinocitákkal, melyekben a kontroll sejteknél nagyobb mennyiségben fejeződött ki az involucrin, a filaggrin és a keratinocita specifikus transzglutamináz-1 (310). Kísérleteiben az adhézións molekulák vizsgálatához egyrészt kontroll HaCaT keratinocitákat (normál HaCaT), másrészt a PKC izoenzimeket túltermelő, overexpresszor HaCaT sejteket használtunk, az UVB besugárzás és ösztadiol kezelésnél kontroll HaCaT sejteket alkalmaztunk.

A kontroll HaCaT sejteket termosztált körülmények között, 37 °C-on, 5% CO₂-tartalmú atmoszférában, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO, USA) tápoldatban tenyésztettük, amely 10 % embrionális borjú szérumot (FCS) (Invitrogen, Paisley, UK), 2 mM L-glutamint, valamint a bakteriális és gombafertőzés elkerülése végett 50

U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomycint és 1,25 µg/ml fungizont (Biogal, Debrecen, Magyarország) tartalmazott. A PKC overexpresszor (illetve az „üres” vektorral transzfektált) HaCaT sejteket hasonló körülmények között, ugyanakkor (a folyamatos szelekció fenntartásának érdekében) 500 µg/ml geneticin antibiotikumot (Invitrogen) tartalmazó FCS-sel kiegészített DMEM médiumban tenyésztettük.

IV.3.18. HaCaT sejtek UVB besugárzása

A besugárzást megelőzően a szubkonfluens tenyészetekben a mediumot kicseréltük PBS-re, mely mentes minden fotoreaktív összetevőtől. Legalább egy olyan tenyészet volt, mely nem kapott UV fényt, de hasonló módon kezeltük mint a besugárzott sejteket. A többi tenyészetet pedig 200 J/m² dózisú UVB fénynek (Saalman Multitester lámpa; Saalman GmbH, 32049 Herford, Germany) tettük ki. A besugárzást követően a PBS-t a megfelelő mediumra cseréltük és a sejteket a 1. 3. 6. 12. 24. 48. és a 72. órában learattuk.

IV.3.19. HaCaT sejtek ösztradiol kezelése

A vízdékony 17-β-ösztadiol (Sigma) oldatot közvetlenül a kísérletek előtt készítettük el. A HaCaT sejteket 50%-os konfluenciáig tenyésztettük, és az ösztadiol-t ezt követően alkalmaztuk 10⁻⁸ M-os végkoncentrációban. Az inkubáció 12, 24, 48 és 72 órán át tartott.

IV.3.20. Western (immuno)blot

A tenyésztett sejteket hideg foszfát-pufferben (PBS) mostuk, majd lízis-pufferben (5 mM EGTA, 20 mM Tris-Cl, 20 µM leupeptin, 1 mM 4-(2-aminoetil)-benzénszulfonil-fluorid, pH 7,4; Sigma) homogenizáltuk, végül ultrahangos szonikálóval a sejteket feltártuk (311). Az így elkészített minták proteintartalmának meghatározása BCA fehérjekimutató assayvel (Pierce, Rockford, IL, USA) történt. Ezután azonos proteintartalmú mintákat (2 mg/ml) SDS mintapufferben (10 % glicerin, 2 % SDS, 0,062 M Tris, 20 mM ditiotritol, 0,002 % brómfenolkék és 5 % β-merkaptotanol; Sigma) 10 percig főztük. Az így elkészített mintákat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) (312) választottuk el 100 V konstans feszültségen. A gélelektroforézishez 7,5%-os gél készítettünk, amelyekre 20 µg/vályú proteint vittünk fel. Ezután a gélről a fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk 100 V konstans feszültségen. Ezt követően a membrán szabad kötőhelyeit 5 % tej tartalmazó PBS-sel 30 percig blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges

antitesttel inkubáltuk. Az elsődleges antitestekből a megfelelő hígítást 5 % tejet tartalmazó PBS-ben készítettük el, majd a membránokat egy éjszakán keresztül 4°C-on inkubáltuk. Az inkubációt követően a membránokat 30 percig mostuk PBST-ben (0,1 % Tween-20 PBS-ben, Sigma), majd az elsődleges antitest speciesének megfelelő torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:1000 hígítás 5 % tejet tartalmazó PBS-ben) (BioRad) inkubáltuk. Az immunjelek rögzítése minden esetben kemiluminescens (ECL) kit (Pierce) segítségével valósult meg. A kvantitatív kifejeződés megállapításakor az immunoblot eredményeket denzitometriás analízisnek is alávetettük, GelDoc rendszert (BioRad) alkalmazva. A különféle adhéziós molekulák kimutatására egérben termeltetett monoklonális antitesteket használtunk; mindhárom antitest (anti-dsg-1, anti-dsg-3, anti-P-cad) a Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA) terméke. Vizsgáltuk emellett a PKC izoformák kifejeződését, nyúlban termeltetett poliklonális antitesteket felhasználva; az anti-PKC α -t, β -t és ϵ -t a Sigmatól, míg az anti-PKC δ -t Santa Cruztól vásároltuk. Az endogén kontrollként használt fehérjék kimutatására citokrom-C és β -aktin ellenes antitesteket (mindkettő Santa Cruz) alkalmaztunk.

IV.3.21. RNS izolálás és cDNS átírás

Az RNS-t a tenyésztett keratinocitákból és HaCaT sejtekből Ultraturrax-szal tártuk fel Trizolban (Sigma), mely Chomczynski guanidin-tiocianát - fenol módszerén alapul (313,314). Az RNS-t tovább tisztítottuk guanidin-hidrokloriddal (315).

Az RNS-ből reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t készítettünk SuperScript készlet (GIBCO) segítségével.

IV.3.22. Polimeráz láncreakció

1. A Ro 46 kD-hoz tartozó (kalretikulín) mRNS erősítése: a következő primerpárt használtuk a reakcióhoz: 5': GAAACATGAGCAGAACATCGACTGTG; 3': CAAAGTTATCATAGGC-ATAGAGATACTGG, mely az eredeti cDNS szekvencia 356 bázisától 1000 bázisig terjedően fogta közre az erősítendő génszakaszt, s így a termék 644 bp hosszú lett (316).

2. A Ro 52 kD-hoz tartozó mRNS-hez az alábbi primereket alkalmaztuk: 5': TCTAGGATTCACGCAGAGTTTGTGC; 3': ATCTCTCTTCATTTCCAGGTATGCTC. Az erősített génszakasz hossza 448 bp, az eredeti szekvencia 526-973 bázisáig (316).

3. A Ro 60 kD-hoz tartozó mRNS-nél a következő primerpárral végeztük az erősítést: 5': AGTCATTTAGTCAAGAAGGCAGAACC; 3': GACCTGTCTTGTAAGTTTCTAATGCG.

Az eredeti cDNS szekvencia 417 bázisától az 1187 bázisig terjed az erősített rész, ami 771 bp hosszú terméket eredményez (317).

4. Az La 1 exon mRNS-nél alkalmazott primerpárok a következők voltak: 5': CTTCTGTGGG-CCGGAACCTTAAAG; 3': CTGTTGTTAGACGGTTCAACCTGTTG, ahol a 3' primer a többi La forma 3' primere is volt. Az eredeti cDNA szekvenciában a -31-es pozíciótól a 190 bázisig terjedt az erősített rész, így 221bp hosszú lett az erősített DNS (271).

5. Az La 1' exon mRNS-hez az 5' primer az alábbi volt: TTCTAGTCTCACCG-AAGGCTTGTG. A primer pozíciójából eredően (-237) az erősített rész 427 bp hosszú (271).

6. Az La 1'' exon mRNS-nél alkalmazott 5' primerként a következő oligot használtuk: TTTCAG-TGTGAAACGGGAAAACGTG. Az erősített DNS 428 bp hosszú.

Az erősítésnél alkalmazott körülmények az alábbiak voltak: denaturálás: 94 C°, 15"; hozzáillesztés: 65-71 C° (a primerektől függően), 15"; szintézis: 72 C°, 30", és 40-45 ciklusban végeztük a DNS erősítést Perkin Elmer 9600 készülékben, 25 µl végtérfogatban, Amplitaq/Stoffel polimerázzal (Perkin Elmer), annak standard oldatösszetételében.

Az erősítésekben kapott DNS-t 3%-os agaróz gélen futtattuk, majd etidium-bromiddal festve UV fényben tettük láthatóvá. A futtatás eredményét polaroid kamerával rögzítettük.

IV.3.23. Kvantitatív real-time PCR (Q-PCR)

A Q-PCR-t egy ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük, 5' nukleáz assay alkalmazásával, wellenként a teljes RNS cDNS átiratának 1 µl-ét használva. A PCR reakció TaqMan primerek és probe-ok (Assay ID: Hs00176973_m1 for PKCα; Assay ID: Hs00176998_m1 for PKCβ1; Assay ID: Hs00178914_m1 for PKCδ; Assay ID: Hs00178455_m1 for PKCε) segítségével történt, TaqMan Universal PCR Master Mix Protocolt (Applied Biosystems) használva. Belső kontrollként β-aktin (BA) és gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (Assay ID: Hs99999905_m1 for human GAPDH) transzkripcióját végeztük el.

IV.3.24. RNS interferencia (RNSi)

A 40-50% konfluenciájú kontroll HaCaT sejteket egy éjszakán át antibiotikum mentes tápoldatban tenyésztettük. Első lépésként a „lecsendesíteni” kívánt PKC izoenzimnek megfelelő RNSi próba (Santa Cruz) 4 µl-ét és 10 µl Lipofectamin 2000 anionos detergenst (Invitrogen) feloldottunk 500-500 µl OptiMEM tápoldatban (Gibco), majd 5 perc eltelté után összekevertük és tápoldattal 5 ml-re egészítettük ki. Ezt az elegyet adtuk a calcium és magnézium mentes PBS-sel kétszer mosott sejtekre. 5 óra elteltével lecseréltük a tenyésztő

oldatot. A kontrollként használt sejteket, a specifikus RNSi próba elhagyását leszámítva, azonos módon kezeltük. A beavatkozás hatékonyságát (mely soha nem okozott nagyobb sejtpusztulást, mint 10-15%, ábrán nem mutatva) 24, 48, 72 és 96 óra elteltével Western blot és Q-PCR technikákkal ellenőriztük.

IV.3.25. Statisztikai analízis

Az eredmények eloszlását Kolmogorov-Szmirnov teszttel vizsgáltuk. A normális eloszlású adatok eredményeit átlag \pm SD értékben fejeztük ki, és a két csoport összehasonlítására a Student-féle kétmintás t próbát alkalmaztuk. A nem-normális eloszlású csoportok adatainak eredményét mediánban, és un. interkvartilis tartományban (IQ) fejeztük ki, megadva a változók 25 és 75 percentilis értékeit. Két nem-normális eloszlású csoport összehasonlításánál Mann-Whitney U tesztet használtunk, míg több csoport összehasonlításánál a „One way ANOVA” eljárást alkalmaztuk, mivel matematikai transzformáció segítségével sem sikerült normális eloszlású adatokat kapnunk. Az adatsorok páronkénti összehasonlítását Dunn teszttel végeztük. Az összefüggéseket Spearman korrelációs koefficiens segítségével fejeztük ki. A $P < 0.05$ -ös értéket tekintettük szignifikánsnak. Adataink elemzését SIGMAStat, 2.03-as verziójú szoftverrel végeztük.

V. Eredmények és megbeszélés

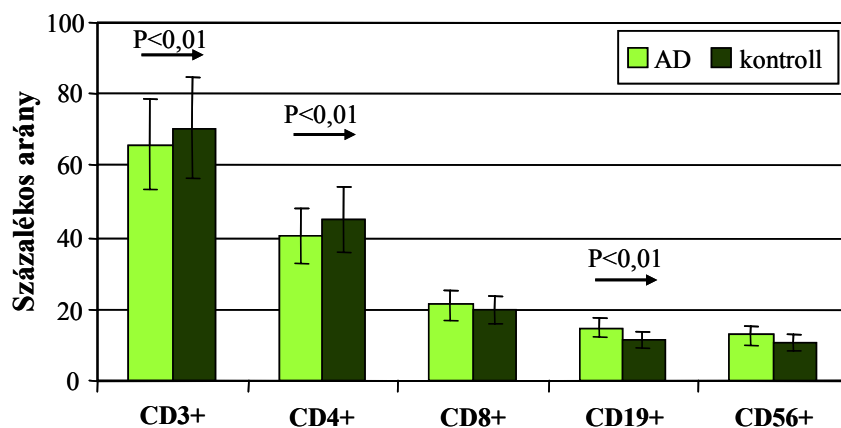
V.1. Atopiás dermatitis

V.1.1. Eredmények

1. A limfocita szubpopulációk és az aktivált T sejtek arányának meghatározása AD-ben szenvedő betegek perifériás vérében (n=43)

AD-ben a CD3+ T és a CD4+ Th sejtek százalékos arányának szignifikáns csökkenését tapasztaltuk, míg a CD8+ Tc sejtek arányában változást nem észleltünk (CD3+ sejtek: $65,8 \pm 8,2$ % versus $70,3 \pm 7,2$ %, $P < 0,01$; CD4+ sejtek: $40,2 \pm 6,1$ % versus $45,1 \pm 7,6$ %, $P < 0,01$; CD8+ sejtek: $21,2 \pm 4,9$ % versus $19,7 \pm 5,9$ %). A CD19+ B sejtek százalékos aránya AD-ben szenvedő betegek esetében szignifikánsan emelkedett volt ($14,7 \pm 5,0$ % versus $11,7 \pm 4,0$ %, $P < 0,01$), míg a CD56+ NK sejtek aránya a kontrollokhoz hasonlóan alakult ($12,7 \pm 8,2$ % versus $10,8 \pm 4,9$ %) (6. ábra).

Az aktivált T-sejt populációk közül a CD3+/HLA-DR+ sejtek aránya szignifikánsan emelkedett, míg a CD3+/CD69+ sejtek aránya nem tért el a referens egyénekben mért értékektől (8. táblázat).



6. ábra: Perifériás vér limfocita alosztályok megoszlása AD-ben (n=43, $P < 0,01$ minden esetben).

2. A T limfociták intracitoplazmatikus citokinjeinek meghatározása AD-ben szenvedő betegek perifériás vérében (n=43)

AD-ben szenvedő betegek CD4+ és CD8+ T sejtjeinek IFN- γ expressziója szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll egyének T sejt szubpopulációinak IFN- γ

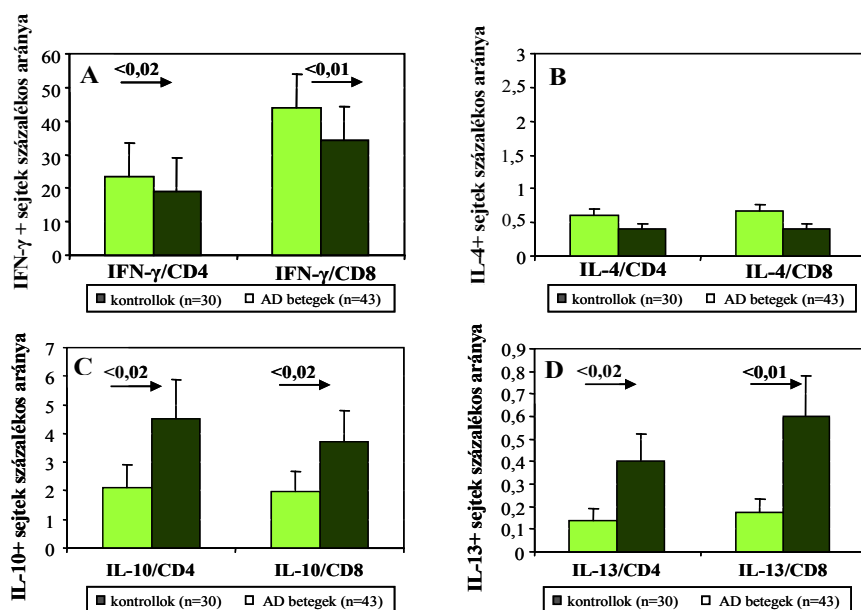
tartalmához képest. Az IL-4 expresszió sem a Th, sem a Tc sejtekben nem mutatott szignifikáns különbséget összevetve a kontrollok hasonló adataival. Egy másik klasszikusan Th2 citokinként ismert molekulát, az IL-13-t vizsgálva azonban azt tapasztaltuk, hogy a CD4+ és CD8+ T sejtek IL-13 expressziója egyaránt szignifikáns emelkedést mutatott a betegekben. Párhuzamosan az IL-13-mal, az IL-10 is szignifikáns magasabb volt AD-ben, mind a két vizsgált T sejt szubpopulációban (7. ábra).

A Th1/Th2, Tc1/Tc2 arányt az IFN- γ +/CD4+ és IL-4+/CD4+, valamint az IFN- γ +/CD8+ és IL-4+/CD8+ sejtek hányadosaként adtuk meg. Az AD-ben szenvedő betegek Th1/Th2 arányának középértéke 97,0 (minimum-maximum: 5,9-802,0) volt, ami jelentősen nem különbözik a kontrollokban számolt aránytól (medián 47,7, minimum-maximum: 12,3-660,0). A Tc1/Tc2 arányokban sem tudunk eltérést kimutatni (AD-ben a Tc1/Tc2 arány mediánja: 121,7, minimum-maximum: 9,7-726,5; kontrollokban a Tc1/Tc2 mediánja: 132,6, minimum-maximum: 12,1-636,0).

Mivel AD-ben szenvedő betegek esetében nem IL-4, hanem IL-13 vonatkozásában kaptunk szignifikáns eltérést a kontroll egyének adataihoz képest, a Th1/Th2 arányt úgy is meghatároztuk, hogy az IL-13+/CD4+, illetve IL-13+/CD8+ sejtek százalékos adatait használtuk. Így a Th1/Th2 arány nem szignifikáns, de jelentős, míg a Tc1/Tc2 arány szignifikáns csökkenését tudtuk kimutatni AD-ben a kontrollokhoz képest (Th1/Th2 mediánja AD-ben: 67,5; minimum-maximum: 9,3-1190,1; kontroll egyénekben a medián 162,4; minimum-maximum: 56,4-885,0; Tc1/Tc2 arány AD-ben szenvedő betegekben: 67,3; minimum-maximum érték: 2,4-417,1; kontrollokban az arány mediánja: 309,7; minimum-maximum: 49,4-530,0; $P < 0,01$).

| | AD-s betegek | Kontrollok | Szignifikancia szint |
|---|-----------------|-----------------|----------------------|
| Aktivált T-sejtek aránya (%) | | | |
| CD3+/HLA-DR+ | 5,4 \pm 4,5 | 3,2 \pm 2,3 | <0,01 |
| CD3+/CD69+ | 0,91 \pm 0,52 | 0,95 \pm 0,91 | n.sz. |
| Szolubilis citokin szintek (pg/ml) | | | |
| Szolubilis IFN-γ | 19,3 (0-171,2) | 11,2 (0-115,4) | n.sz. |
| Szolubilis IL-4 | 3,2 (0-17,9) | 0,95 (0,1-47,4) | n.sz. |
| Szolubilis IL-13 | 0,33 (0,0-5,3) | 0,10 (0,0-9,3) | <0,01 |
| Szolubilis IL-10 | 11,8 (0,1-72,3) | 5,1 (0,10-31,9) | <0,01 |

8. táblázat: AD-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok aktivált T sejtjeinek aránya és szérumban szolubilis IFN- γ , IL-4, IL-13 valamint IL-10 koncentrációja. Az aktivált T sejtek meghatározása során kapott értékeket átlag \pm SD, a szolubilis citokinek koncentrációit medián (minimum-maximum) formában adtuk meg. (n.sz.: nem szignifikáns).



7. ábra: Intracitoplazmatikus citokin szintek perifériás vér T sejtekben AD-ben (n=43).

3. Szolubilis citokinek koncentrációjának meghatározása AD-es betegek szérumában

Az intracitoplazmatikus citokin vizsgálatokkal párhuzamosan, meghatároztuk az AD-s betegek, illetve kontrollok szérumában a szolubilis IFN- γ , IL-4, IL-13 és IL-10 koncentrációkat.

A keringő IFN- γ , IL-4 szintekben nem találtunk eltérést, míg az IL-13 és IL-10 koncentrációja az AD-ben szenvedő betegek szérumában szignifikánsan magasabb értékeket mutatott az egészségesekben mért adatokhoz képest (8. táblázat).

4. TLR-ok számának vizsgálata perifériás vér monocitákon, granulocitákon és limfocitákon AD-ben (n=30)

Monociták

Perifériás vér monocitákon a TLR2 expresszió szignifikánsan emelkedett volt az AD-es csoportban a kontrollhoz hasonlítva (TLR2: AD-es csoport: 5167 ± 1961 , kontroll: 4029 ± 1460 , $P < 0.03$; (8/A ábra). A betegeket két csoportra osztva ezt az eltérést azonban csak az IAD-es csoportban tudtuk kimutatni, az EAD csoportban nem (TLR2: IAD-s csoport: 6024 ± 1826 , $P < 0.004$). A TLR4 szám a monociták felszínén szintén szignifikánsan megemelkedett az IAD-es csoportban a kontrollhoz viszonyítva (IAD: 474 ± 153 , kontroll: 331 ± 70 , $P < 0.02$). A TLR2 és TLR4 kimutathatósága EAD-ben a monociták felszínén nem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollokhoz viszonyítva (TLR2: 4739 ± 1931 , TLR4: 372 ± 175). A monocitákon megjelenő CD14 és CD180 mennyisége sem a teljes AD-es

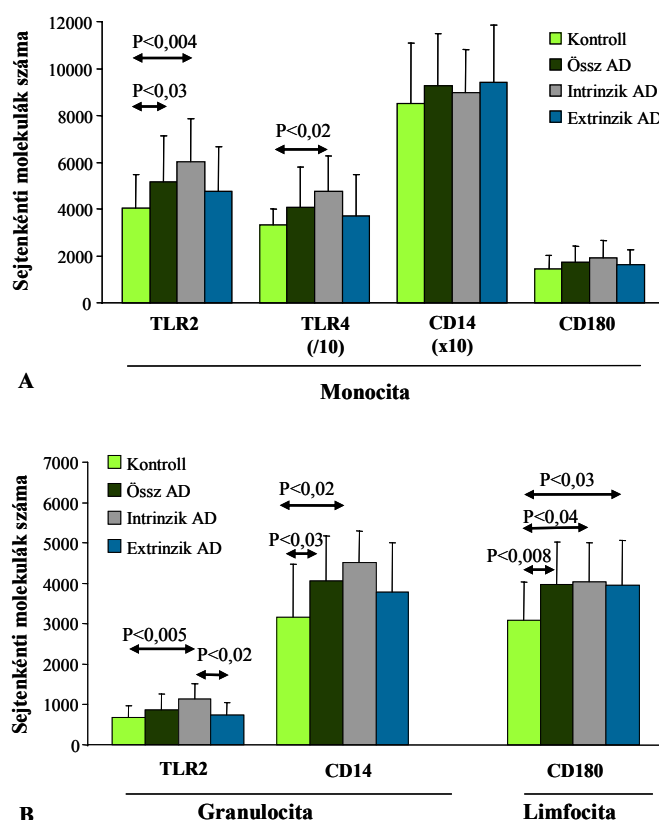
populációban, sem az intrinzik és extrinzik csoportokban nem volt jelentősen eltérő a kontroll sejteken kimutatható mennyiségtől (8/A ábra).

Granulociták

Perifériás vér granulocitákon a CD14 expresszió szignifikánsan emelkedett volt a teljes AD-es csoportban és az IAD csoportban is (AD-es csoport: 4051 ± 1127 , $P < 0.03$; IAD: 4518 ± 783 , $P < 0.02$, kontroll: 3150 ± 1318 , 8/B ábra), a TLR2 expresszió pedig csak az IAD-es csoportban mutatott szignifikáns emelkedést a kontrollhoz viszonyítva (AD-es csoport: 866 ± 386 , $P < 0.08$; IAD: 1125 ± 394 , $P < 0.005$, kontroll: 681 ± 2769 ; 8/B ábra).

Limfociták

A perifériás vér vizsgálata során a CD180+ limfocitákon belül a sejtfelszíni CD180 össz mennyisége szignifikánsan magasabb volt mind a teljes AD-es populációban, mind az intrinzik és extrinzik csoportokban (AD-es csoport: 3975 ± 1055 , $P < 0.008$; IAD: 4028 ± 968 , $P < 0.04$; EAD: 3949 ± 1126 , $P < 0.03$; kontroll: 3089 ± 948 ; 8/B ábra).



8. ábra: Perifériás vér monociták (A), granulociták és limfociták (B) sejtfelszíni CD14, TLR2, TLR4 és CD180 expressziója AD-ben, IAD-ben és EAD-ben (n=30).

5. Toll receptorok funkcionális vizsgálata AD-ben (n=30)

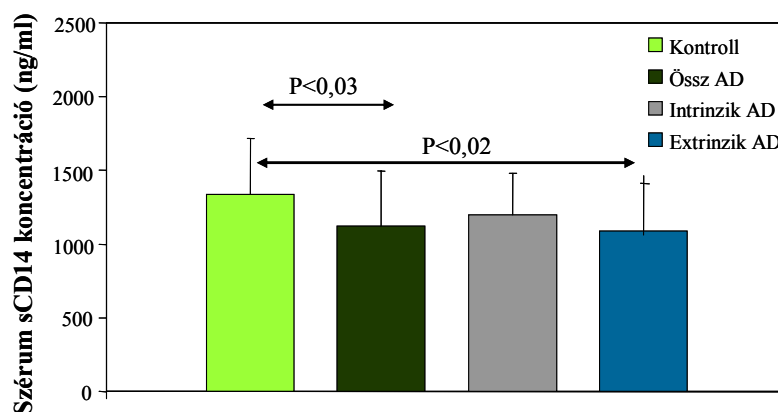
A perifériás vér monociták és granulociták CD14 mediálta LPS kötésében és *E. coli* fagocitózisában nem volt kimutatható eltérés az AD-es csoport és a kontrollok között (9. táblázat).

| | LPS kötés | fagocitáló sejtek %- a | fagocitózis index |
|--------------------|-------------|------------------------|-------------------|
| MONOCITA | | | |
| Kontroll | 43,1 ± 33,1 | 21,1 ± 21,1 | 0,50 ± 0,94 |
| Össz AD | 51,1 ± 26,5 | 22,6 ± 16,6 | 0,40 ± 0,38 |
| Intrinzik AD | 58,5 ± 32,9 | 23,9 ± 16,6 | 0,37 ± 0,27 |
| Extrinzik AD | 48,0 ± 23,7 | 22,0 ± 17,0 | 0,42 ± 0,43 |
| GRANULOCITA | | | |
| Kontroll | 8,7 ± 5,7 | 15,8 ± 11,1 | 0,35 ± 0,33 |
| Össz AD | 6,4 ± 4,4 | 12,5 ± 6,1 | 0,25 ± 0,15 |
| Intinzik AD | 5,0 ± 2,4 | 14,1 ± 5,8 | 0,24 ± 0,07 |
| Extrinzik AD | 6,8 ± 5,0 | 11,8 ± 6,3 | 0,26 ± 0,17 |

9. táblázat: CD14-dependens bodipy-LPS and bodipy-*E.coli* kötés meghatározása kontrollok és AD-ben szenvedő betegek teljes vér monocitáin és granulocitáin (n=30).

6. sCD14 mérése AD-es betegek szérumában (n=30)

A szérumban kimutatható sCD14 szint szignifikánsan alacsonyabb volt AD-ben és az EAD-es csoportban mint a kontroll populációban (AD-es csoport: 1119,9±372,5 ng/mL, $P<0.03$; EAD: 1084,2±407,9 ng/mL, $P<0.02$; kontroll: 1334,4±385,7 ng/mL, 9. ábra).



9. ábra: Szérumban mért sCD14 szintek AD-ben, valamint IAD és EAD csoportokban (n=30).

V.1.2. Megbeszélés

Citokin termelés vizsgálata atopiás dermatitisben

Citokin termelési mintázatuk alapján mind a Th mind a Tc sejtek csoportokra oszthatók fel: Th1, Th2, Th3, Tc1, Tc2. Ezen sejtek, valamint a regulatórikus T sejtek különböző típusai által termelt citokinek kölcsönösen befolyásolva egymás működését egy roppant finoman szabályozott rendszerként befolyásolják az immunológiai folyamatokat. Az egyensúly felborulása számos betegség patogenezisében fontos tényezőnek tekinthető. Th1 sejtek dominanciáját írták le bizonyos szervspecifikus autoimmun betegségekben, így például autoimmun diabetes mellitusban, sclerosis multiplexben, valamint hemophagocitotikus lymphohistiocitosisban, akut graft-versus-host reakció esetén (318,319). Az atopiás-allergiás megbetegedések, valamint a SLE egyes alcsoportjai esetén Th2 dominancia igazolható ugyanúgy, mint szeptikus állapotban, ahol emelkedett Th2 arány felelős a csökkent sejtes immunreaktivitásért (320,321).

Vizsgálataink során AD-ben tanulmányoztuk a perifériás vér limfociták megoszlását, aktivitási állapotukat és citokin termelésüket. Saját vizsgálatainkban AD-ben szenvedő betegek esetében szignifikánsan csökkent CD3+ és CD4+ T sejt, valamint szignifikánsan emelkedett CD19+ B limfocita arányt találtunk. A perifériás vér T és B limfocita populációk megoszlására vonatkozó eredmények ellentmondásosak az irodalomban. Több közlemény is emelkedett CD4+ és CD8+ T sejt számot írt le, míg mások saját eredményeinkhez hasonlóan csökkent számot észleltek, és inkább a gyulladás súlyossági fokára jellemzőnek tartják ezt a paramétert, mint a betegségre szenzitív markernek (322-324). A csökkent CD3+ és CD4+ T sejt számok ellenére szignifikánsan emelkedett CD3+/HLADR+ aktivált T sejt számot tudtunk kimutatni. Walker és mtsai szignifikánsan emelkedett HLADR+ CD4+ T sejt számot találtak, hasonlóan Kagi és mtsai is szignifikánsan emelkedett aktivált CD4+ és CD8+ T sejt számot közöltek (91,322).

Az irodalomban a betegek perifériás T limfocitáin végzett intracitoplazmatikus citokin termelési vizsgálatok adatai csökkent IFN- γ és emelkedett Th2 típusú citokin termelésről számolnak be, ugyanakkor nem egységes az irodalom abban, hogy az IL-13 vagy az IL-4 termelés felelős-e elsősorban a Th2 típusú hatásokért (320,325). Nakazawa az IL-4 termelés, míg Akdis és Teraki az IL-13 termelés dominanciáját emelte ki közleményében (42,67,320,326). A mi eredményeink szerint elsősorban az IL-13 termelő sejtek aránya fokozódott és nem az IL-4 termelő sejtek száma emelkedett meg. Eredményeink az IL-13 domináns szerepét támasztották alá AD-ben. Az IL-13 az aktivált Th2 sejtek és a hízósejtek

által termelt citokin. Szerkezetében és hatásait tekintve is nagy hasonlóságot mutat az IL-4-gyel, többek között elősegíti az IgE és IgG4 izotípusú ellenanyagok termelődését (327-329). A Th2 sejtek aktiválódását követően szintézise korábban indul, és hosszabb ideig fennmarad mint az IL-4 termelődése. Eredményeink szerint az IL-4 termelés sem a CD4+, sem a CD8+ T sejtekben nem volt emelkedett. Az irodalomban Jung és mtsai szintén nem tudták az IL-4 termelő sejtek számának emelkedését kimutatni, míg Nakazawa szignifikánsan emelkedett IL-4 termelő T sejt számot detektált (320,330). A különbségek feltehetően az intracitoplazmatikus citokin mérések módszerében mutatkozó eltérésekkel magyarázhatók. Ugyanakkor Katagiri és mtsai RTPCR módszerrel sem tudott fokozott IL-4 mRNS szintet kimutatni AD-ben a perifériás vér fehérvérsejtekben (331).

Vizsgálataink során ugyancsak megállapítottuk, hogy AD-ben a perifériás vérben az 1-es típusú citokint, IFN- γ -t termelő T sejtek aránya szignifikánsan csökkent. AD-ben a perifériás vér T sejtek csökkent IFN- γ termelését több más kutatócsoport is közölte és az atopiás állapot alapvető jellemzőjének tartják (320,331-333).

Ezen eredményekkel párhuzamosan az IL-10 termelő T limfociták számát szignifikánsan emelkedettnek találtuk a perifériás vérben. Az IL-10-et kezdetben Th2 sejtek által termelt citokinnek tartották, de újabb adatok kiemelkedő fontosságú, elsősorban immunregulatív hatású citokinnek ismerik el. A regulatórikus T sejtek közül a Tr1 sejtek termelik. Az IL-10 gátló hatást fejt ki a Th1 sejtek és a makrofágok működésére, valamint képes az IL-12 termelés gátlásán keresztül csökkenteni az IFN- γ termelődését (334,335). Véleményünk szerint a saját vizsgálatainkban mért szignifikánsan magasabb számú IL-10 termelő T sejtek Tr1 sejtek voltak, melyek specifikus kimutatására használható sejtfelszíni marker jelenleg nem ismert. Az irodalomban először detektáltuk az IL-10 termelő T sejtek szignifikánsan magasabb számát AD-s betegek perifériás vérében rámutatva arra, hogy a nagy számban detektálható IL-10 termelő T sejtek regulatív sejtek lehetnek. Növekedett számuk és a fokozott IL-10 termelésük regulatív szerepet játszhat AD-ben a felborult Th1/Th2, Tc1/Tc2 egyensúly helyreállításában. 2006-ban megjelent közleményünkben Verhagen és mtsai AD-ben a lézionális bőrben is ki tudták mutatni az IL-10 termelő Tr1 sejtek számának növekedését (61).

Az intracitoplazmatikus citokin vizsgálatok eredményét alátámasztják a szérumban szolubilis citokin szintjeinek mérése során nyert adatok is. Mind az IL-10, mind az IL-13 szint szignifikánsan emelkedett volt, míg az IL-4 nem mutatott eltérést a kontrollokhoz viszonyítva. Fontos annak kiemelése, hogy az általunk észlelt fokozott IL-13 és IL-10

termelés, valamint a csökkent IFN- γ szintézis nem csupán a Th, de a Tc sejtekben is észlelhető volt. Megfigyeléseinket a nemzetközi irodalom elfogadta, több munkacsoport, közöttük számos elismert szaktekintély összefoglaló közleményekben említi (336-338).

Vizsgálatainkban betegeinket EAD-ben és IAD-ben szenvedők két csoportjára osztottuk és a kapott eredményeket összehasonlítottuk a két csoportban. Beteganyagunkban nem találtunk szignifikáns eltérést az IAD és EAD-ben szenvedők adatainak összehasonlítása során, kivéve az emelkedett IgE és IgG szinteket EAD-ben. Kagi és mtsai emelkedett IL-4 és IL-5 szintet mértek EAD-ben a perifériás vérben, míg Novak és mtsai ezzel ellentétben IAD-ben találtak emelkedett IL-13 szintet (91,92). Ugyanakkor számos irodalom arról számol be, hogy a két csoport között a különbség elsősorban a bőr citokin mintázata között mutatható ki. (40,91).

Kiemelendő AD-ben a perifériás vér Th2/Tc2 típusú sejtjeinek dominanciája a Th1/Tc1 sejtekhez viszonyítva. Ezt az eltérést saját vizsgálataink is megerősítették, azonban nem az IL-4, hanem az IL-13 termelő T limfociták szerepét tudtuk kiemelni. A betegségre jellemző Th2/Tc2 túlsúly jelentőséggel bírhat az AD patomechanizmusában. A Th2/Tc2 citokinek szerepet játszhatnak a humorális immunrendszer aktiválásában, a B sejtek számának és aktivitásának növekedésében, az allergén specifikus IgE fokozott termelésében és így végső soron a betegség tüneteinek kialakulásában.

Toll szerű receptorok vizsgálata atopiás dermatitisben

AD-ben a gyakori bőrfertőzések nemcsak jellegzetes klinikai tünetként jelentkeznek, de fontos patogenetikai szerephez is jutnak a betegségre jellemző gyulladás kiváltásában és fenntartásában. A *S. aureus* peptidoglikánjai fokozzák a makrofágok, eozinofil sejtek, keratinociták és T sejtek proinflammatorikus citokin termelését, az exotoxinok poliklonális T sejt aktivációt és specifikus IgE termelést is képesek indukálni. A bakteriális infekciók mellett fontosak a vírusok és gombák okozta fertőzések is. Az AD-ben szenvedő betegek károsodott bőr barrier funkciója, a csökkent antibakteriális peptid termelés és a plazmocitoid dendritikus sejtek hiánya az epidermisben mind hozzájárulhat a fertőzések gyakoribb előfordulásához. Ismert olyan közlemény, mely szerint a TLR2 gén polimorfizmusa összefüggést mutat az AD súlyosságával, bár mások ezt később cáfolták (339,340). Nincs adat az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a TLR-ok számbeli vagy funkcionális eltérései kimutathatók-e a fertőzések gyakori kialakulásának hátterében AD-ben.

Vizsgálatainkban AD-ben a perifériás vér fehérvérsejtekben nem tudtuk kimutatni sem a TLR-ok csökkent számát, sem pedig károsodott funkcióját. Ezzel ellentétben monocitákon

szignifikánsan emelkedett TLR2, granulocitákon CD14, limfocitákon CD180 expressziót találtunk. Véleményünk szerint a fokozott TLR sejtfelszíni jelenlét AD-ben a folyamatos mikrobiális stimulus következménye. Irodalmi adatokból ismert, hogy Gram pozitív és negatív baktériumok termékei képesek fokozni a TLR2, TLR4 és CD14 expressziót fehérvérsejteken és szepszisben is fokozódik ezen sejtfelszíni receptorok megjelenése (341-344). Az AD-re jellemző károsodott epidermális barrier megteremti a lehetőségét annak, hogy a különböző bakteriális termékek bekerüljenek a keringésbe és stimulálják a fehérvérsejtek felszínén a TLR expresszióját.

Az általunk AD-ben kimutatott TLR szám növekedés még kifejezettebb volt az AD intrinzik csoportjában, szignifikánsan emelkedettnek találtuk a monociták felszínén a TLR2 és TLR4 szintet, a granulocitákon a TLR2 és CD14 szintet és a limfocitákon a CD180 expressziót. Ugyanakkor az extrinzik csoportban nem találtunk szignifikáns eltérést. Mivel az IAD-ben nem mutatható ki gyakrabban fertőzés, mint az extrinzik formában, ez nem magyarázhatja az eltérést. Véleményünk szerint az IAD-ben, ahol hiányzik a külső allergén mint provokáló ágens, a sejtek felszínén megjelenő fokozott TLR expresszió egy bakteriális komponensekre mutatott esetleges hiperreaktivitás jelzője lehet. A bakteriális komponensek így erős trigger faktorként szerepelhetnek a gyulladás elindításában és fenntartásában. Új irodalmi adatok kimutatták, hogy IAD-ben a mikrobiális komponensek ellen specifikus IgE termelés indul be és saját adataink alapján mi is egyetértünk a szerzők feltételezésével, miszerint az AD intrinzik formájának patogenezisében a mikrobiális ágensek elleni hiperreaktivitás elsődleges szerepet játszik (95).

Vizsgálataink során a TLR-okon keresztüli LPS kötés és E. coli fagocitózis nem mutatott károsodást sem AD-ben sem az IAD vagy az EAD csoportokban.

A fokozott sejtfelszíni CD14 expresszió nem jár feltétlenül emelkedett sCD14 szinttel (345). A sCD14 szintet több irodalmi közleményben vizsgálták, azonban a kapott eredmények ellentmondásosak. Zdosek és mtsai saját eredményeinkkel egyezően csökkent sCD14 szintet mértek, míg Wütrich és mtsai emelkedett értékekről számoltak be, de vannak olyan közlések is, ahol nem találtak a szerzők szignifikáns eltérést (346-348). Az eltérő eredmények háttérében a vizsgált csoportok inhomogenitása és eltérő laboratóriumi technikák alkalmazása állhat.

Az AD-re jellemző gyakori bőrfertőzések háttérében tehát a perifériás vér fehérvérsejteken nem tudtuk a TLR-ok csökkent számát vagy káros funkcióját kimutatni. Ezzel ellentétben szignifikánsan emelkedett számot találtunk, melyet következményes jellegűnek tartunk. IAD csoportban ez a jelenség még kifejezettebben volt megfigyelhető, ami

tovább erősíti az irodalomban korábban felvetődött hipotézist, miszerint a mikrobiális ágensek patogenetikai szerepet játszhatnak az IAD kialakulásában.

V.2. Psoriasis vulgaris és psoriasisos arthropathia

V.2.1. Eredmények

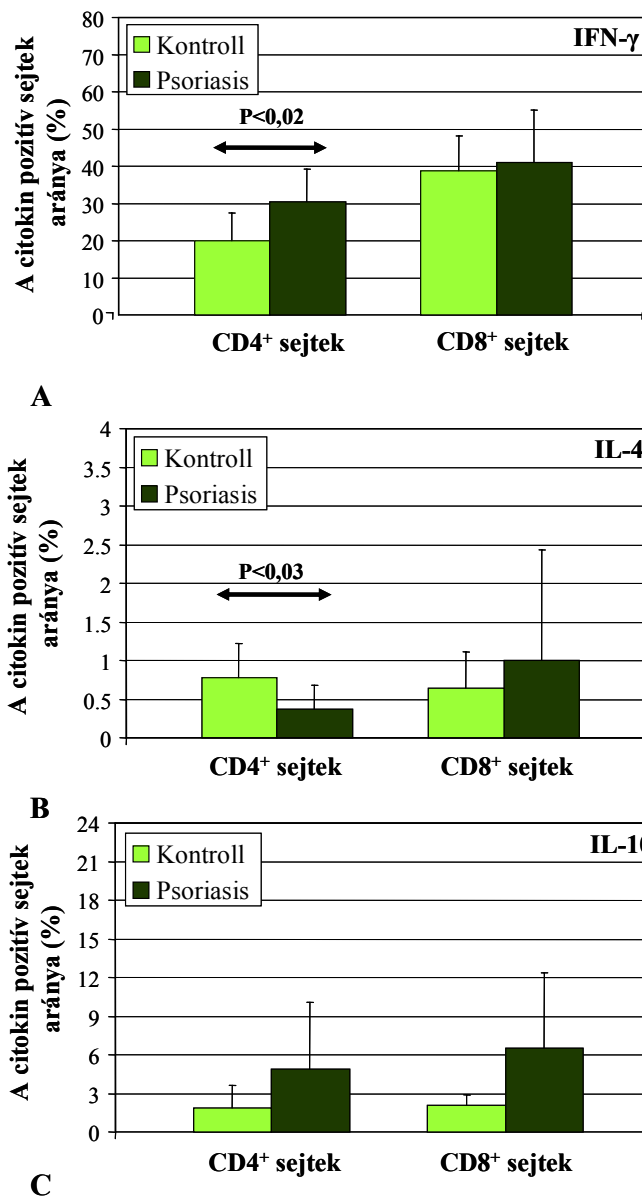
1. Perifériás vér T sejtek intracitoplazmatikus citokinjeinek meghatározása psoriasis vulgarisban (n=18)

A betegek CD4⁺ Th sejtjeinek 30,3±8,8 %-a expresszálja stimuláció hatására az IFN- γ -t, ami szignifikánsan magasabb Th1 százalékos arányt jelent psoriasisban, mint amit az egészséges kontrollok (20,1±7,3 %) esetében mértünk (P<0,02). A CD8⁺ Tc sejtek vonatkozásában ezt az emelkedést nem találtuk meg, a Tc1 sejtek IFN- γ expressziója nem különbözött jelentősen a referensekben mért értéktől (10/A ábra).

A CD4⁺/IL-4⁺ Th2 sejtek aránya szignifikánsan csökkent a betegek (0,37±0,31 %) esetében a kontrollokhoz (0,78±0,44 %) képest (P<0,03). A CD8⁺/IL-4⁺ Tc2 sejtek aránya a kontrollokban mért adatokhoz képest nem mutatott eltérést (10/B ábra).

Mind a CD4⁺, mind a CD8⁺ T sejtek intracitoplazmatikus IL-10 expressziója jelentős emelkedést mutatott a vizsgált psoriasis vulgarisban szenvedő betegcsoportban az egészségesekhez képest, de a változás egyik T sejt szubpopulációban sem érte el a szignifikancia szintet (10/C ábra).

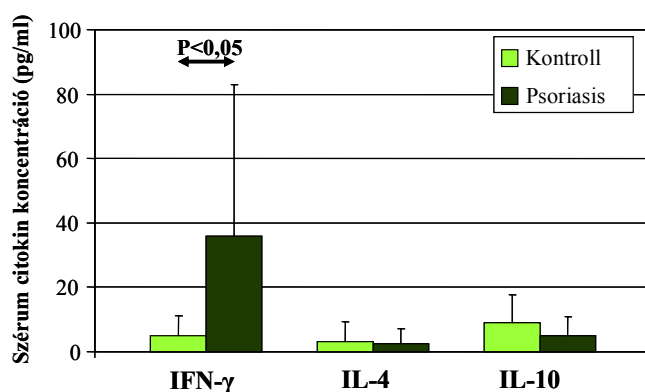
Az CD4⁺/IFN- γ ⁺ Th1 sejtek valamint az CD4⁺/IL-4⁺ Th2 sejtek százalékos arányának hányadosa (Th1/Th2) psoriasis vulgarisban szenvedő betegekben szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll egyénekben számított értékekhez viszonyítva (mean: 120,1 min-max: 22,2-735,3 vs mean: 22,7; min-max: 14,9-103,1; P<0,03). A Tc1/Tc2 arányokban nem találtunk szignifikáns különbséget (mean: 100,0; min-max: 4,8-1253,1 vs mean: 101,0; min-max: 20,4-505,1).



10. ábra: IFN- γ , IL-4 és IL-10 termelő CD4⁺ Th és CD8⁺ Tc sejtek arányának eloszlása psoriasis vulgarisban (n=18) és a kontroll csoportban (n=10).

2. Szérumból szolubilis citokinek meghatározása psoriasis vulgarisban (n=18)

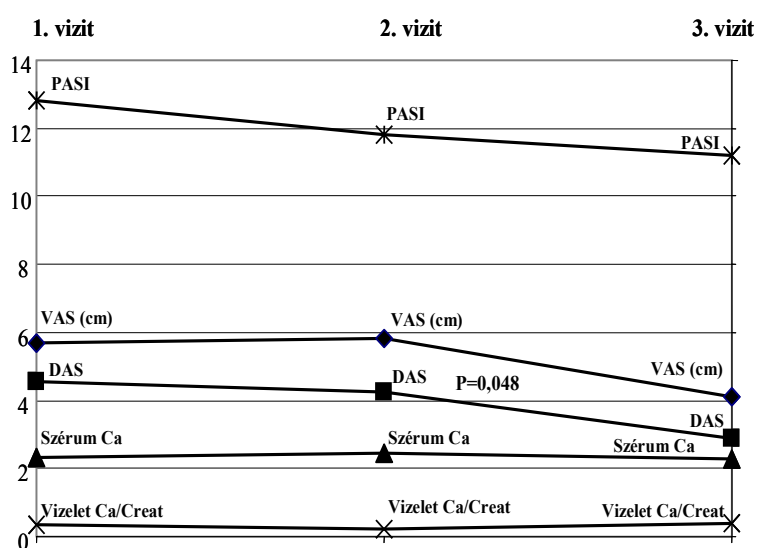
Fagyasztott szérumból klasszikus ELISA technikával meghatároztuk a keringő IFN- γ , IL-4 és IL-10 koncentrációját. Az IFN- γ szintje szignifikánsan emelkedett psoriasis vulgarisban szenvedő betegek szérumában a kontroll egyének értékeihez képest ($P < 0,05$). Ezzel szemben a keringő IL-4 és IL-10 koncentrációjában nem találtunk szignifikáns eltérést az egészséges kontrollokban meghatározott IL-4 és IL-10 értékekhez képest (11. ábra).



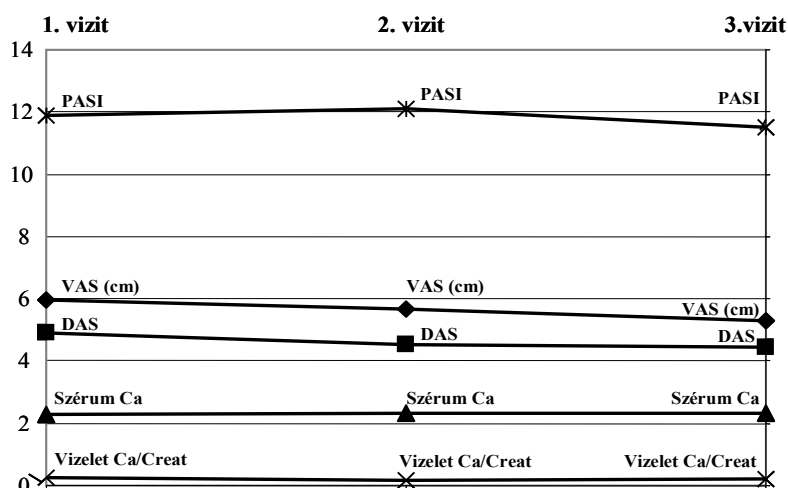
11. ábra: Szérumban mért IFN- γ , IL-4 és IL-10 szintek psoriasis vulgarisban (n=18) és a kontroll csoportban (n=10).

3. Alphacalcidol kezelés során megfigyelt klinikai és rutin laboratóriumi változások psoriasisos arthropathiában szenvedő betegeknél (n=10)

Induláskor a klinikai (VAS, PASI, DAS28) és laboratóriumi adatok nem különböztek jelentősen a kezelt és a kontroll csoportban. A két csoport főbb klinikai paramétereit az 12. és 13. ábra mutatja be. A vizsgálat 6 hónapja alatt a kezelt csoportban a DAS28 folyamatos, szignifikáns csökkenését észleltük ($P=0,048$ az első és a harmadik vizit között), míg a PASI és VAS értékek ugyancsak csökkenést mutattak, de a változás nem volt szignifikáns. A kontroll csoportban szignifikáns változás nem volt megfigyelhető. A többi klinikai és rutin laboratóriumi paraméterben (beleértve a szérum calcium szintet és a vizelet calcium/creatinin ürítés arányát) érdemi eltérést nem találtunk a vizsgálat során.



12. ábra: Az alphacalcidollal kezelt betegek klinikai adatai (a $P=0,048$ érték az 1. és a 3. vizit DAS értékei közötti szignifikáns eltérést jelzi, n=10).



13. ábra: A kontroll csoport klinikai adatai (n=9).

4. Alphacalcidol kezelés során megfigyelt immunológiai laboratóriumi változások psoriasisos arthropathiában szenvedő betegeknél (n=10)

Induláskor a két csoport immunológiai paramétereit között érdemi különbség nem volt kimutatható. A kezelt csoport immunológiai laboratóriumi paramétereit a 10. táblázat, a kontroll csoport értékeit pedig a 11. táblázat mutatja be. Hat hónapig tartó alphacalcidol kezelés után megismételt vizsgálatok adatait áttekintve a következő eredményeket kaptuk:

1. Statisztikailag szignifikáns eltérést nem észleltünk a CD3+, CD4+, CD8+, CD4+/CD25+ T sejtek, a CD19+ B sejtek, az NK (CD56+) sejtek, a CD3+/HLADR+ aktivált T sejtek és a monociták (CD14+/CD16+, CD14+/CD16-) számarányában.

2. Szignifikáns mértékben csökkent viszont a CD3+/CD69+ aktivált T sejtek ($1,54 \pm 1,15\%$ versus $0,56 \pm 0,33\%$, $P=0,04$), valamint az IFN- γ termelő CD8+ T sejtek aránya ($7,6 \pm 3,44\%$ versus $4,34 \pm 3,02\%$, $P=0,04$) az első három hónapban. A CD4+/ IFN- γ +, CD4+/IL-4+ és CD8+/IL-4+ T sejtek száma nem változott szignifikáns módon.

3. A szérum citokin szinteket elemezve az IFN- γ szint statisztikailag szignifikáns csökkenését észleltük ($34,34 \pm 25,1$ pg/ml versus $5,47 \pm 4,0$ pg/ml, $P=0,03$) a vizsgálat első három hónapjában. Az IL-4 és IL-10 szintekben érdemi változást nem találtunk.

A kontroll csoport immunológiai paramétereiben érdemi változást nem észleltünk 6 hónap után (11. táblázat).

| | 1. vizit | 2. vizit | 3. vizit | P (1-2. vizit között) | P (1-3. vizit között) |
|---------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| CD3+ sejtek (%) | 68,5 ± 6,19 | 68 ± 6,14 | 66,8 ± 4,87 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+ sejtek (%) | 42,5 ± 5,68 | 47 ± 8,37 | 42,8 ± 9,15 | n.sz. | n.sz. |
| CD8+ sejtek (%) | 22,7 ± 9,73 | 17,71 ± 9,91 | 21,4 ± 5,94 | n.sz. | n.sz. |
| CD19+ sejtek (%) | 9,1 ± 3,03 | 10,8 ± 4,78 | 10,2 ± 3,03 | n.sz. | n.sz. |
| CD56+ sejtek (%) | 19 ± 6,04 | 16,43 ± 6,7 | 18 ± 4,42 | n.sz. | n.sz. |
| CD3+/HLADR+ sejtek (%) | 3,5 ± 2,59 | 2,14 ± 0,9 | 4 ± 3,32 | n.sz. | n.sz. |
| CD3+/CD69+ sejtek (%) | 1,54 ± 1,15 | 0,56 ± 0,33 | 1,52 ± 0,51 | P=0,048 | n.sz. |
| CD14+/CD16- sejtek (%) | 33,73 ± 11,09 | 31,6 ± 7,4 | 40,68 ± 19,16 | n.sz. | n.sz. |
| CD14+/CD16+ sejtek (%) | 19,26 ± 13,45 | 28,39 ± 6,98 | 35,08 ± 16,76 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/IFN-γ+ sejtek (%) | 8,95 ± 2,76 | 9,83 ± 3,02 | 10,12 ± 4,21 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/IL-4+ sejtek (%) | 0,23 ± 0,26 | 0,15 ± 0,14 | 0,16 ± 0,08 | n.sz. | n.sz. |
| CD8+/IFN-γ+ sejtek (%) | 7,6 ± 3,44 | 4,34 ± 3,02 | 6,3 ± 3,03 | P=0,047 | n.sz. |
| CD8+/IL-4+ sejtek (%) | 0,05 ± 0,03 | 0,04 ± 0,02 | 0,06 ± 0,05 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/CD25+ sejtek (%) | 2,69 ± 1,69 | 2,19 ± 1,01 | 1,9 ± 0,83 | n.sz. | n.sz. |
| Szolubilis IFN-γ (pg/ml) | 34,34 ± 25,1 | 5,47 ± 4 | 36,22 ± 21,22 | P=0,037 | n.sz. |
| Szolubilis IL-4 (pg/ml) | 5,32 ± 11,02 | 11,7 ± 16,6 | 5,16 ± 15,6 | n.sz. | n.sz. |
| Szolubilis IL-10 (pg/ml) | 8,52 ± 7,09 | 9,3 ± 10,0 | 4,5 ± 14,6 | n.sz. | n.sz. |

10. táblázat: Az alphacalcidollal kezelt csoport immunlaboratóriumi paramétereit (n=10, n.sz.= nem szignifikáns).

| | 1. vizit | 2. vizit | 3. vizit | P (1-2. vizit között) | P (1-3. vizit között) |
|--------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|--------------------------|
| CD3+ sejtek (%) | 73,3 ± 5,48 | 68,4 ± 7,33 | 68 ± 12,9 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+ sejtek (%) | 51,44 ± 3,17 | 49,2 ± 5,54 | 50,2 ± 2,77 | n.sz. | n.sz. |
| CD8+ sejtek (%) | 17,78 ± 3,63 | 16,2 ± 4,6 | 15 ± 7,87 | n.sz. | n.sz. |
| CD19+ sejtek (%) | 11,56 ± 6,82 | 15,4 ± 6,23 | 15,2 ± 5,67 | n.sz. | n.sz. |
| CD56+ sejtek (%) | 16 ± 11,26 | 12,4 ± 6,15 | 12,4 ± 5,41 | n.sz. | n.sz. |
| CD3+/HLADR+ sejtek (%) | 4,22 ± 2,77 | 2,88 ± 2,47 | 2,8 ± 2,49 | n.sz. | n.sz. |
| CD3+/CD69+ sejtek (%) | 1,88 ± 1,39 | 1,16 ± 0,86 | 1 ± 0,47 | n.sz. | n.sz. |
| CD14+/CD16- sejtek (%) | 47,1 ± 8,96 | 47,76 ± 21,33 | 39,06 ± 24,46 | n.sz. | n.sz. |
| CD14+/CD16+ sejtek (%) | 19,77 ± 6,02 | 15,7 ± 8,46 | 33,3 ± 23,31 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/IFN-γ+ sejtek (%) | 10,94 ± 7,33 | 12,85 ± 3,02 | 11,17 ± 7,35 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/IL-4+ sejtek (%) | 0,23 ± 0,21 | 0,25 ± 0,35 | 0,13 ± 0,11 | n.sz. | n.sz. |
| CD8+/IFN-γ+ sejtek (%) | 6,16 ± 3,22 | 6,66 ± 4,14 | 4,93 ± 3,92 | n.sz. | n.sz. |
| CD8+/IL-4+ sejtek (%) | 0,06 ± 0,06 | 0,07 ± 0,01 | 0,05 ± 0,04 | n.sz. | n.sz. |
| CD4+/CD25+ sejtek (%) | 2,46 ± 0,75 | 2,07 ± 1,27 | 2,09 ± 2,51 | n.sz. | n.sz. |
| Szolubilis IFN-γ (pg/ml) | 26,32 ± 15,1 | 15,86 ± 11,4 | 21,14 ± 18,22 | n.sz. | n.sz. |
| Szolubilis IL-4 (pg/ml) | 4,44 ± 4,42 | 5,38 ± 7,95 | 3,96 ± 4,01 | n.sz. | n.sz. |
| Szolubilis IL-10 (pg/ml) | 5,53 ± 7,69 | 3,23 ± 5,69 | 2,68 ± 4,39 | n.sz. | n.sz. |

11. táblázat: A kontroll csoport immunlaboratóriumi paramétereit (n=9, n.sz.= nem szignifikáns).

V.2.2. Megbeszélés

Citokin termelés vizsgálata psoriasisban

A psoriasis vulgaris egy olyan immunológiailag meghatározott bőrgyógyászati kórkép, melynek patogenezisében kiemelkedő szerepe van a T limfocitáknak (105,349-351). Az egyik első bizonyítéka volt ennek a cyclosporin A, majd később egyéb limfocita illetve T limfocita szelektív (anti-CD2 és anti-CD4 antitestek) terápiák hatékonysága psoriasisban (352-362). Ugyancsak ezt támasztják alá azok a megfigyelések miszerint csontvelő transzplantáció után a donor psoriasisos tünetei megjelenhetnek a recipiensben, illetve egészséges donor esetén a korábban psoriasisos recipiens tünetmentessé válhat (363,364). Wrona-Smith és Nickoloff kísérlete, melynek során súlyos kombinált immundeficienciában (SCID) szenvedő egerek bőrébe tünetmentes psoriasisos bőrt ültettek, majd az egerekbe egy beteg T limfocitáit juttatva a tünetmentes bőr plakkosodását váltották ki, szintén a T sejtek kulcsszerepét bizonyítja roppant elegáns módon (365). Arra vonatkozóan kezdetben nem volt egységes az irodalom, hogy ezt a hatást a CD4⁺ Th sejtek vagy a CD8⁺ Tc sejtek plakkba való beáramlása okozza (100). Ezért SCID-es egerekbe beültetett tünetmentes psoriasisos bőrbe nagy tisztaságú, szeparált CD4⁺ illetve CD8⁺ sejteket injektáltak. A CD4⁺ sejtek kiváltották az addig tünetmentes bőr plakkosodását, míg CD8⁺ sejtek esetében ezt a hatást nem tudták kimutatni (366). Később azonban igazolódott, hogy a folyamat kialakulásához mindenképpen szükség van az epidermisben található, felszínükön CD25-t és CD69-t hordozó aktivált CD8⁺ Tc sejtekre is (367). A Th és Tc sejtek citokin mintázatának elemése alapján több munkacsoport is alátámasztotta, hogy a psoriasisos bőrben elsősorban Th1 és Tc1 sejtek és az általuk termelt IFN- γ játszik szerepet a keratinociták aktiválásában, és a bőrtünetek kialakításában (109,112-114,118,368).

A perifériás vérben azonban a Th1 sejtek dominanciája mellett nem sikerült a Tc1 sejtek dominanciáját kimutatni, melynek hátterében állhat az alkalmazott módszer hiányossága, miszerint a korábbi vizsgálók szeparált perifériás mononukleáris sejteket alkalmaztak. A szeparálás során azonban megváltozhat a sejtek számos funkciója és elveszhetnek a természetes környezetükben lévő szérumkomponensek. Elsőként arra kerestünk választ, hogy psoriasisban szenvedő betegek perifériás vér T sejtjei, izolálás nélküli teljes vér festési technika alkalmazásával milyen citokin termelési mintázatot mutatnak illetve, hogy a CD4⁺ Th sejtek citokin mintázata megtalálható-e a CD8⁺ Tc sejtekben.

Munkánk során igazoltuk azokat az irodalmi adatokat, melyek szerint psoriasisban, a perifériás vérben szignifikánsan emelkedik a Th1 típusú sejtek aránya. Kimutattuk a CD4⁺

sejtek IFN- γ expressziójának emelkedését, amit kísér az IL-4 expresszió csökkenése, vagyis a Th1/Th2 arányban szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. Eredményeinkre többen is hivatkoznak a szakirodalomban kiemelve, hogy vizsgálatainkat teljes vérből végeztük (369,370). A CD8+ T limfociták citokin profiljának tekintetében azonban teljes vér festési módszerrel sem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a betegek és kontrollok között, vagyis nem volt domináns Tc1 működés megfigyelhető (119,371). Ez valamelyest ellentmondásosnak tűnhet, mivel számos bizonyíték utal a Tc1 sejtek lokális jelenlétére és jelentőségére a psoriasisos bőrtünetek kialakulásában (11,112,118,119). Egy lehetséges magyarázat, ami a cirkuláló és lokális Tc sejtekre jellemző citokin profil eltérését magyarázhatja az, hogy ezek a bőrt infiltráló Tc1 sejtek nem aktiváltak lépnek ki keringésből, hanem a Th sejtek és APS-ek által helyileg aktiválódnak (100,118). A Th1 sejtek dominanciáját erősíti, hogy változatlan IL-4 és kismértékben csökkent IL-10 koncentrációk mellett szignifikánsan fokozott IFN- γ koncentrációt detektáltunk a betegek szérumában. Chodorowska és mtsai szintén szignifikánsan emelkedett IFN- γ koncentrációt mértek psoriasisos betegek szérumában, míg Elkayam munkájában szignifikáns IL-10 szint csökkenést közölt psoriasisos betegeken (372,373).

Eredményeink nagymértékű hasonlóságot mutatnak az Austin és mtsai által közölt adatokkal, akik hasonló áramlási citometriás módszert és intracelluláris festést használtak a lokális és keringő T sejtek citokin profiljának meghatározására (119). A cirkuláló CD4+/IFN- γ + sejtek aránya hasonlóan bizonyult a két vizsgálatban, míg saját adataink alapján tízszer alacsonyabbnak találtuk a CD4+/IL-4+ sejtek százalékos arányát, és következményesen a Th2/Th1 arány is tizedrészére csökkent. Ez az eltérés technikai különbségekből adódhat. Habár Austin és mtsai ugyanazokat a stimuláló ágenseket (PMA, ionomycin és Brefeldin A) alkalmazták, de amíg mi a teljes vérben lévő T sejtek citokin profilját *ex vivo*, természetes környezetükben próbáltuk meg vizsgálni, ők izolált perifériás vér mononukleáris sejteket vagy CD4+ és CD8+ T sejteket használtak, emellett hosszabb inkubációs időket alkalmaztak. A sejt izolálás és a hosszabb inkubációs idő magyarázhatja ezen sejtek kifejezettebb aktivációját és az ennek eredményeképpen jelentősen emelkedett IL-4+ T sejt arányt.

Számos bizonyíték utal arra, hogy az IL-10 molekula, amelyet korábban Th2 citokinnek tartottak jóval általánosabb regulatórikus szerepet tölt be az immunológiai folyamatokban. Gátolni képes a specifikus antigén által indukált proliferációt és citokin termelést a Th1 és Th2 sejtekben egyaránt, csakúgy, mint bizonyos makrofág funkciókat és szintén gátló hatást fejt ki az IL-12 által indukált IFN- γ termelésre (374,375). Ki kell emelni, hogy vizsgálatainkban fokozott IL-10 expressziót találtunk mind a Th, mind a Tc sejtekben,

jelezve, hogy a szervezet az IL-10 szint emelésével törekszik a felborult Th1/Th2 egyensúly helyreállítására. Asadullah és mtsai psoriasis vulgarisban szenvedő betegek esetében a bőrben alacsony IL-10 mRNS szintet mutattak ki, antipszoriátikus kezelés hatására pedig azt találták, hogy perifériás vér mononukleáris sejtjeiben emelkedik az IL-10 mRNS szintje (113). Ezek alapján feltételezték, hogy az IL-10 hatékony lehet a psoriasis terápiájában és intrakután alkalmazták három betegnél. Nem csupán hatékonyságot, de a kezdetben alacsony IL-10 mRNS szint emelkedését is ki tudták mutatni a bőrben. További vizsgálatok az IL-10 antipszoriátikus hatását nem közvetlenül a keratinocitákra, hanem a perifériás vér mononukleáris sejtjeire kifejtett hatásával magyarázzák (376). Austin és mtsai a perifériás vér T sejtek magasabb, de nem szignifikáns IL-10 emelkedését írták le (119). A mi eredményeink egybevágóak ezekkel az irodalmi adatokkal, emelkedett IL-10 szinteket mértünk, bár a különbség a kis esetszám és a nagy egyéni eltérések miatt nem adódott szignifikánsnak. Véleményünk szerint a psoriasis olyan jellemzően krónikus gyulladásos megbetegedés, ahol a keringő IL-10+ T sejtek magasabb száma egy ellenregulációs mechanizmus része lehet, mely megpróbálja gátolni a Th1 sejtek fokozott aktivitását.

Az alphacalcidol hatásának vizsgálata psoriasis arthropathiában

Az aktív D₃ vitaminnak illetve analógjainak immunmoduláns hatását számos vizsgálat bizonyítja. Spach és Hayes kimutatták, hogy nőstény egerekben a myelin bázikus proteinnel kísérletesen előidézett experimentális autoimmun encephalitisben (EAE) a tünetek kialakulásához szükséges indukciós idő nő és azok súlyossága csökken akkor, ha az állatokat D₃ vitaminban gazdag diétán tartják (377). Amennyiben a már kialakult EAE esetén kezdtek el a D₃ vitamin adagolását, akkor a betegség progressziója megállt, de a D₃ vitamin elhagyása a betegség újbóli aktiválódásához vezetett. Mathieu és mtsai kimutatták, hogy calcitriol adagolása a NOD (non-obese diabetic) egértörzsben megakadályozta az IDDM kialakulását. (148). Mások állatmodellben a calcitriol akut allograft kilökődési reakció súlyosságát csökkentő és a graft túlélési idejét növelő hatását figyelték meg kísérletes máj transzplantációt követően (378). Hasonló megfigyeléseket közölt Redaelli és munkacsoportja patkányban vese allotranszplantációt követően, az immunmoduláns hatás erőssége pedig, a cyclosporin A hatásával összemérhetőnek mutatkozott (379). II típusú kollagén indukált arthritises állatmodellben alphacalcidol alkalmazása az arthritises tünetek incidenciáját és az ízületi duzzanat súlyosságát egyaránt csökkentette, illetve a II. típusú kollagén elleni autoantitestek titere szintén szignifikánsan alacsonyabb volt az alphacalcidollal kezelt, mint a kontroll csoportban (380). Cantorna és munkatársai két, kísérletes állatmodellben (Borrelia

Burgdorferi és kollagén indukálta arthritisben) is megfigyelték, hogy calcitriol kezelés képes az arthritises tünetek kialakulását megelőzni, illetve a már kialakult betegségben a tünetek progresszióját leállítani (381).

Viszonylag kevés olyan humán vizsgálat áll azonban rendelkezésre, mely az aktív D₃ vitamin vagy analógjai hatását vizsgálja különféle ízületi gyulladásokban, köztük PA-ban. Yamauchi és munkatársai egy 140 RA-s beteget felölelő kettős vak kontrollált vizsgálatban tanulmányozták a szisztémás alphacalcidol hatását. Ennek során az alphacalcidollal kezelt csoportban minimális, nem szignifikáns csökkenést észleltek a betegség aktivitásában, szemben a placebót kapó csoporttal (382). Hein és munkatársai 20 RA-s beteget kezeltek alphacalcidollal 8 héten keresztül és a reggeli ízületi merevség időtartamának, a duzzadt és nyomás érzékeny ízületek számának, a vörösvérsejt süllyedés sebességének valamint a CRP szintnek nem szignifikáns csökkenését észlelték. Emellett az IL-6 és TNF- α szint nem szignifikáns csökkenését és az IL-4 minimális növekedését is megfigyelték (383). PA-ban a szisztémás alphacalcidol immunmoduláns hatását egyetlen kis esetszámú tanulmány vizsgálta eddig. Huckins és munkatársai egy 6 hónapos nyílt követéses vizsgálatban 10 aktív PA-s beteget kezeltek napi 2 μ g alphacalcidollal. Ennek során szignifikáns javulást észleltek a nyomás érzékeny ízületek számában és az orvos betegség megítélésében. A tanulmányban azonban az immunológiai paramétereket nem vizsgálták (172).

Saját munkánk során a 6 hónapos szisztémás alphacalcidol kezelés szignifikáns immunmoduláns hatását tudtuk kimutatni sokízületi érintettséggel járó PA-s betegekben. Ez a hatás megnyilvánult a DAS28 score-al monitorozott betegség aktivitás folyamatos szignifikáns csökkenésében, a CD69+ aktivált tsejtek és az IFN- γ + CD8+ T limfociták arányának valamint a szérum IFN- γ szintjének átmeneti, az első három hónapban megmutatkozó csökkenésében. Eredményeink más szóval arra utalnak, hogy a szisztémás alphacalcidol kezelés az 1 típusú immunválasz aktivitásának átmeneti, a betegség aktivitásának pedig, folyamatos csökkenését eredményezi.

Ismert tény, hogy mind a psoriasis mind a PA az immunmediált gyulladásos kórképek (IMID) csoportjába tartoznak és elsősorban a Th1 és Tc1 típusú immunválasz játszik szerepet a kialakulásukban. A CD8+ T limfociták mind a bőr, mind az ízületi gyulladás létrejöttében jelentős szerepet töltenek be. PA-ban a szinoviális membránban és a szinoviális folyadékban is jelen vannak CD8+ T sejtek (125). Ezen túlmenően az IFN- γ maga is kiemelt fontossággal bír a PA patogenezisében. Az IFN- γ hatásai közé tartozik a szinoviális membrán sejtjein és a keratinocitákon az antigén prezentálásban szerepet játszó MHC-II molekulák, valamint a

vándorlásban és megtelepedésben szerepet játszó intercelluláris adhéziónak molekulá-1 (ICAM-1) expressziójának és ugyanezen sejtek proinflammatorikus (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) citokin termelésének fokozása (384). Az IFN- γ csökkenti a regulatórikus T sejtek aktivitását és az immunválaszt a Th1 vagy Tc1 típus irányába tolja el (385). A betegség aktivitásában megfigyelhető folyamatos csökkenést magunk is az alphacalcidol hatása révén kialakult csökkent aktivitású Tc1 típusú immunválasszal magyarázzuk. Annak okát, hogy ezen hatás az immunlaboratóriumi leletek alapján átmeneti jellegű, egyelőre nem ismerjük. Vizsgálatunkban a bőrtünetek PASI által jellemzett súlyossága bár mutatott javulást nem volt szignifikáns. Több irodalmi adat számol be szisztémás aktív D₃ vitamin alkalmazásának kedvező hatásáról psoriasis bőrtüneteiben, mely vizsgálatokban azonban az alkalmazott dózisok 2-3 μ g/nap voltak. Feltehetően az általunk alkalmazott alacsonyabb dózis magyarázza, hogy a PASI csökkenés nem volt szignifikáns. Adataink alapján a D₃ vitaminnak illetve aktív metabolitjainak szerepe lehet a PA kezelésében. Immunmoduláns hatása alapján a jelenlegi terápiás fegyvertár hasznos kiegészítője lehet.

V.3. Krónikus urticaria

V.3.1. Eredmények

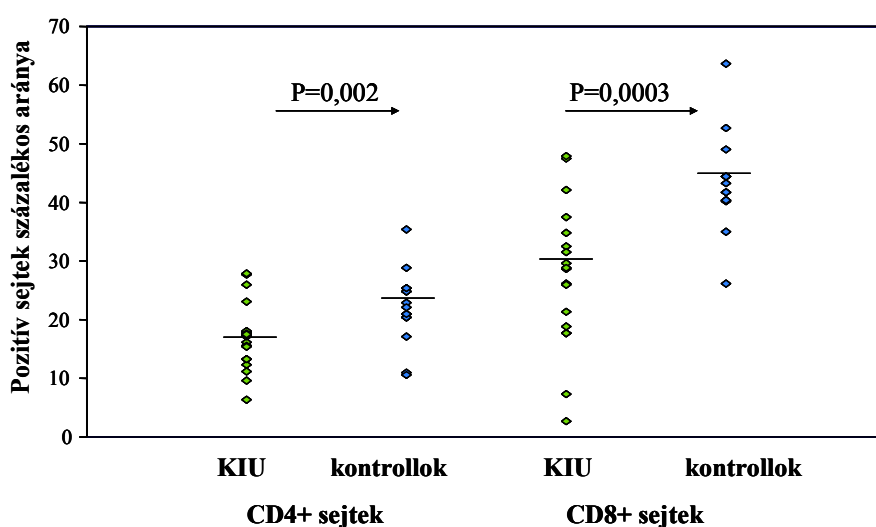
1. Perifériás vér limfocita szubpopulációk meghatározása krónikus idiopátiás urticariás betegekben (n=22)

A sejtfelszíni CD markerek vizsgálata során a CD3+, CD4+, CD8+ illetve CD19+ sejtek esetén jelentős eltérést nem tudtunk kimutatni az egészséges és beteg populáció értékei között. A CD3+ T limfocitákon belül az aktivált T sejtek százalékos arányát is vizsgáltuk. A HLA-DR-t expresszáló T limfociták arányának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a krónikus urticariás betegcsoportban a kontroll csoporthoz képest ($3,84 \pm 2,31$ % versus $1,55 \pm 0,75$ %, $P < 0,01$). A korai aktivációs marker (CD69) esetén nem tapasztaltunk eltérést ($0,92 \pm 0,49$ % versus $0,98 \pm 1,2$ %) a két csoport között.

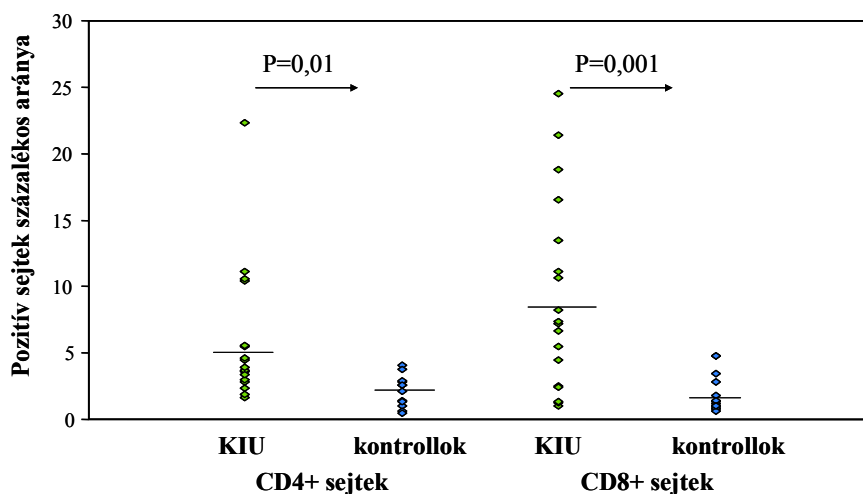
2. Perifériás vér limfociták intracitoplazmatikus citokinjeinek meghatározása krónikus idiopátiás urticariás betegekben (n=22)

A limfociták intracelluláris citokinjeinek vizsgálata során elsőként az IFN- γ expresszióját határoztuk meg. Mind CD4+, mind CD8+ T sejtek esetén szignifikánsan csökkent expressziót tapasztaltunk a KIU-s betegekben a kontroll csoporttal összehasonlítva

($17,0 \pm 5,7$ % versus $22,06 \pm 6,25$ %, $P=0,002$, $27,6 \pm 12,2$ % versus $43,4 \pm 8,45$ % $P=0,0003$, 14. ábra). Az IL-10 expresszióját tanulmányozva a KIU-s betegekben szignifikánsan magasabb számú CD4+ illetve CD8+ T sejt expresszált IL-10 citokint, mint a kontroll csoportban ($6,1 \pm 5,4$ % versus $2,1 \pm 1,19$ %, $P=0,01$, $8,63 \pm 7,21$ % versus $1,98 \pm 1,47$ %, $P=0,001$, 15. ábra). További vizsgálataink során a betegcsoportban az egészséges kontrollokhoz képest a CD4+ T limfociták szignifikánsan csökkent IL-4 expresszióját mértük, míg a CD8+ T sejtekben ezt nem tudtuk kimutatni, ezzel ellentétben emelkedett IL-4 expressziót találtunk, mely eltérés azonban nem volt szignifikáns (12. táblázat). Ugyanakkor az IL-13-t expresszáló CD4+ és CD8+ T limfociták száma nem mutatott szignifikáns emelkedést a kontroll csoporthoz képest (12. táblázat).



14. ábra: CD4+ és CD8+ T sejtek intracelluláris IFN- γ expressziója KIU-s betegekben (n=22).



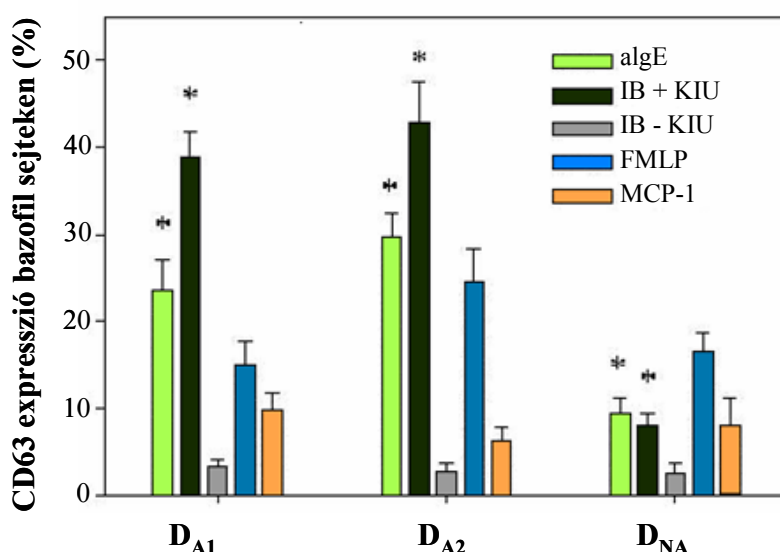
15. ábra: CD4+ és CD8+ T sejtek intracelluláris IL-10 expressziója KIU-s betegekben.

| | IL-4/CD4 (%) | IL-4/CD8 (%) | IL-13/CD4 (%) | IL-13/CD8 (%) |
|----------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Kontrollok (n = 22) | 1,1 ± 0,71% | 0,59 ± 0,72 | 0,14 ± 0,09 | 0,17 ± 0,13 |
| KIU (n = 22) | 0,5 ± 0,86% | 1,22 ± 4,04 | 0,21 ± 0,31 | 0,43 ± 0,48 |
| Szignifikancia szint | 0,03 | n.sz. | n.sz. | n.sz. |

12. táblázat: CD4+ és CD8+ T sejtek intracelluláris IL-4 és IL-13 expressziója KIU-s betegekben (n=22, n.sz.= nem szignifikáns).

3. Donorsejtek reaktivitásának vizsgálata a CD63 BAT és a HR teszt alkalmazásával

A donor bazofil sejtek reaktivitásának meghatározásához FcεR-on keresztül (IgE ellenes antitest, immunoblottal bizonyítottan anti FcεRIα antitest pozitív KIU-s szérum) és G protein kapcsolt receptoron keresztül (FMLP, MCP-1) ható aktiváló ágensekkel inkubáltuk a sejteket. Az anti IgE (aIgE) antitest és az immunoblottal bizonyítottan anti FcεRIα antitest pozitív KIU-s szérum (IB+KIU) szignifikánsan magasabb sejtfelszíni CD63 expressziót idézett elő az D_{A1} és D_{A2} felszínén, mint a D_{NA} sejtek felszínén (mindkét esetben P<0.001, 16. ábra, egy másik mérés eredményei a 13. táblázatban láthatók). Nem volt szignifikáns különbség a donorok CD63 expressziójában IB-KIU szérum, FMLP vagy MCP-1 stimuláció után (16. ábra). A hisztamin felszabadulás vizsgálatánál az anti IgE antitesttel történt inkubáció után szignifikánsan több volt a hisztamin felszabadulás mértéke a D_A sejtekből, mint a D_{NA} sejtekből (P<0,001, 13. táblázat). Az eredmények az D_A bazofil sejtek FcεRI-n keresztüli erőteljesebb stimulálhatóságára utalnak, a D_{NA} sejtekkel összehasonlítva.



19. ábra: KIU-s szérumok és különböző stimuláló szerek hatására bekövetkező sejtfelszíni CD63 expresszió mértékének összehasonlítása D_A és D_{NA} bazofil sejteken (n=30, *P<0,001 a D_{A1}, D_{A2} és D_{NA} között).

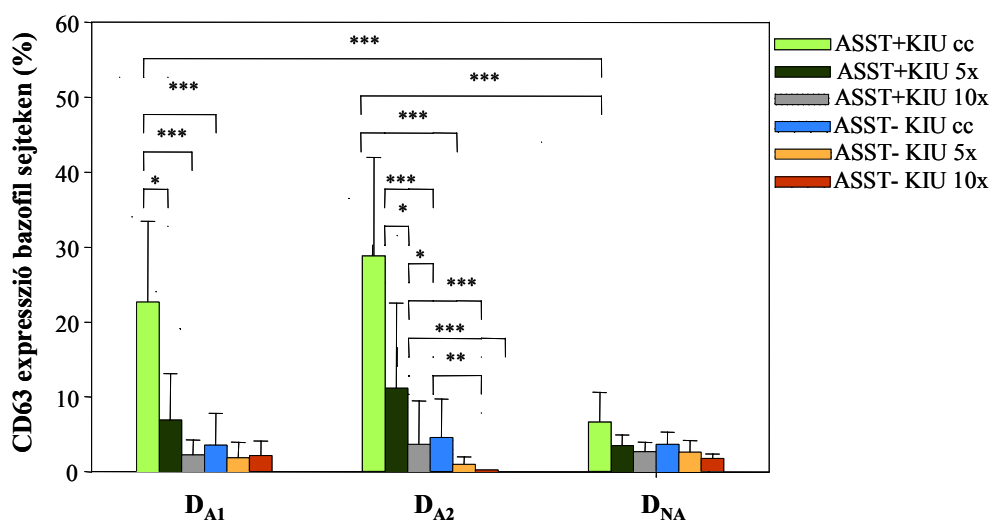
| | CD63 (%) | [átlag ±SD] | P érték | HR (%) | [átlag ±SD] | P érték |
|---------------|----------------|-----------------|------------|----------------|-----------------|------------|
| | D _A | D _{NA} | | D _A | D _{NA} | |
| algE | 40,26±5,71 | 3,30±0,83 | <0,001 sz. | 42,52±3,19 | 5,80±1,43 | <0,001 sz |
| FMLP | 42,90±4,35 | 35,64±5,90 | 0,057 nsz. | 52,95±4,09 | 47,18±6,82 | 0,143 nsz. |
| IB+KIU szérum | 67,86±7,09 | 20,04±4,35 | <0,001 sz | 87,44±6,57 | 61,64±5,33 | 0,169 nsz |

13. táblázat: IB+ KIU-s szérum és különböző stimuláló szerek hatására bekövetkező sejtfelszíni CD63 expresszió és hisztamin felszabadulás mértékének összehasonlítása D_A és D_{NA} bazofil sejteken (n=72, sz= szignifikáns, n.sz.= nem szignifikáns).

4. Krónikus idiopátiás urticariás szérumok hígításaival történt stimuláció után mért

CD63 BAT eredmények D_A és D_{NA} bazofil sejteken (n=30)

A donor sejteket az urticariás szérumok hígításaival inkubáltuk és mértük a sejtfelszíni CD63 expressziót. A krónikus urticariások ASST pozitív, feltételezetten autoimmun csoportjának szérumával (n=12), történt inkubáció a D_A bazofil sejteken szignifikánsan magasabb arányban okozott CD63 expressziót a D_{NA} sejteken előidézt CD63 expresszióhoz mérten (P<0,001 hígítatlan szérumok esetén, 17. ábra). Mindkét D_A bazofil sejtjein az ASST pozitív szérumok szignifikánsan nagyobb CD63 expressziót okoztak az ASST negatív (n=18) csoporthoz képest (P<0,001 hígítatlan szérumok esetén, 17. ábra). A hatás koncentrációfüggő volt, 1:5 hígítás esetén is tapasztalhattuk a szignifikáns expresszivitás különbséget az ASST pozitív és negatív csoport között (P<0,05). 1:10 hígítás esetén már nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az ASST+ és ASST- csoport között.

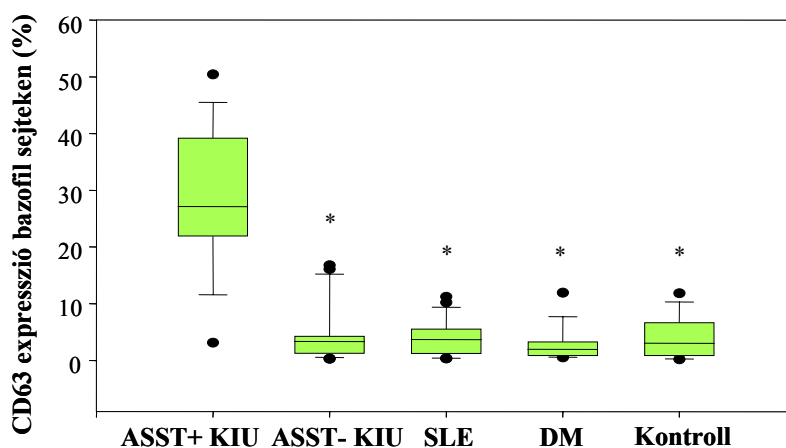


17. ábra: ASST+ és ASST- KIU-s szérumok CD63 expresszióban megnyilvánuló bazofil aktivációt előidéző hatása (n=30, *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001)

5. A CD63 BAT specificitásának vizsgálata különböző betegcsoportok

összehasonlításával

12 egészséges kontroll, 10 DM-es és 16 SLE-s beteg szérumának illetve 30 KIU-s beteg szérumának hatására bekövetkező CD63 sejtfelszíni expressziót vizsgáltuk. Méréseinket ez esetben a D_{A2} donor bazofil sejteken végeztük, mely a korábbi vizsgálatokban az alkalmazott stimulusok (ASST+ szérum, anti-IgE) hatására a legmagasabb CD63 expresszió növekedést mutatta. A feltételezetten autoimmun urticariás csoport szérumával történt inkubáció után (ASST+, n=12) szignifikánsan magasabb expressziót tapasztaltunk az ASST- (n=18), a DM-es, az SLE-s és a negatív kontroll csoportok szérumához képest (P<0,001). Az ASST-, a DM-es, az SLE-s és a negatív kontroll csoport szérumával történt inkubáció nem váltott ki CD63 expressziót a donor sejteken. A 18. ábrán a medián, a 25 és 75 percentilis, valamint a minimum és maximum CD63 expresszió van feltüntetve.



18. ábra: Különböző betegcsoportokból származó szérumok hatására bekövetkező CD63 expresszió mérése D_{A2} donor sejteken (ASST+KIU n=12, ASST-KIU n=18, SLE n=16, DM n=10, kontroll n=12, *P<0,01)

6. A HR és a BAT együttes vizsgálata (n=72)

72 KIU-s szérummal elvégeztük a HR tesztet, a BAT-et és az ASST-et, az adatokat összevetettük és az összefüggéseket vizsgáltuk.

D_A bazofil sejteiből a KIU-s szérumok 51.4 %-a (37/72) szabadított fel nagy mennyiségű hisztamint, míg a D_{NA} sejteiből a szérumoknak csupán 32 %-a (23/72) váltotta ki ezt a hatást (14. táblázat). A D_A sejteit használva a KIU-s betegek széruma szignifikánsan magasabb hisztamin felszabadulást eredményezett (P<0.01), összehasonlítva a D_{NA} bazofiljeivel kapott eredményekkel.

A D_A és D_{NA} bazofilekból hisztamint nagy mennyiségben felszabadító szérumok (HR+) 92 %-a (34/37) és 96 %-a (22/23) adott pozitív eredményt az ASST-ben is. Az ASST + csoportban a KIU szérumok 85 %-a (34/40) indukált hisztamin felszabadulást az D_A , és 55 %-a (22/40) a D_{NA} sejtjein (14. táblázat).

Az ASST+ KIU-s szérumok mindkét donor sejtjeinek esetében (D_A és D_{NA}) szignifikánsan magasabb hisztamin felszabadulást váltottak ki ($P < 0.05$), összehasonlítva az ASST- KIU-s betegek szérumaival (19. ábra). Az SLE-s és DM-es betegek széruma nem szabadított fel hisztamint sem a D_A , sem a D_{NA} sejtekből.

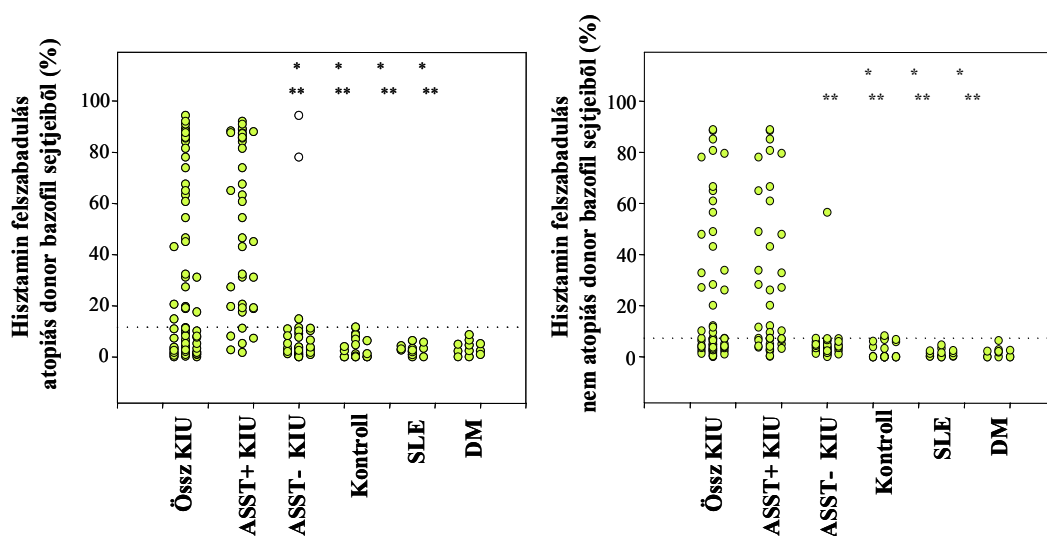
A szérumokat két csoportba osztottuk a hisztamin felszabadulási vizsgálatban (HR) megfigyelt reaktivitásuk alapján (HR+, HR-). A HR+ szérumok 97 %-a (36/37) eredményezett CD63 indukciót a D_A bazofil sejtjein, míg ugyanezen szérumok 83 %-a (19/23) indukált CD63 expressziót a D_{NA} sejtjeit használva (14. táblázat).

A D_A bazofiljainak felszínén a KIU-s szérumok 57 %-a (41/72) indukálta a bazofil aktivációs marker (CD63) expresszióját, míg a D_{NA} sejtjein a szérumok 28 %-a (20/72) váltott ki CD63 expressziót (14. táblázat). A D_A bazofil sejtjein jóval nagyobb mértékű CD63 felszíni expressziót tudtunk kimutatni a KIU-s betegek szérumával történő inkubáció után, mint a D_{NA} bazofiljein ($P < 0.001$) (20. ábra).

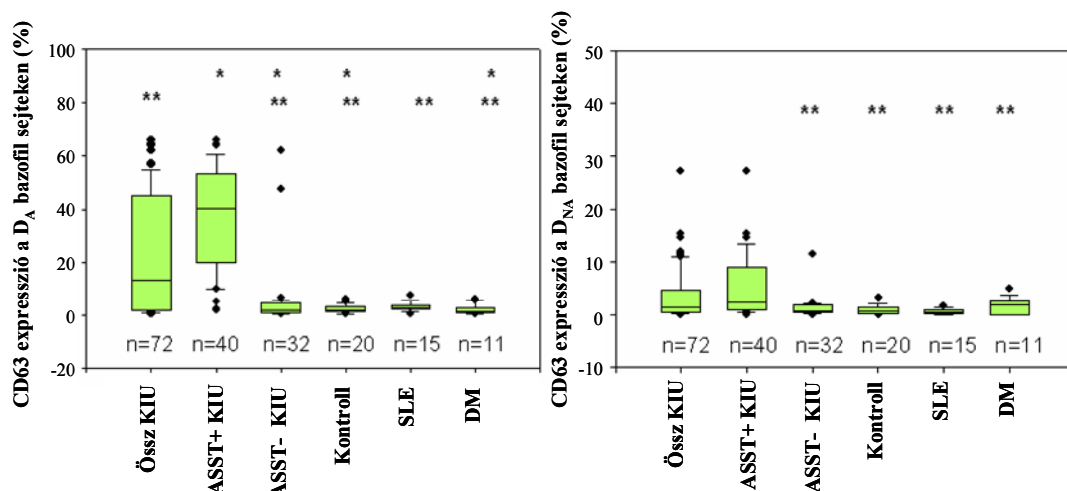
Mindkét donor bazofil sejtjeit HR+ KIU-s szérumokkal indukálva jelentősen nagyobb mértékű ($P < 0.05$) CD63 expressziót tapasztaltunk a sejtek membránjának felszínén, mint a HR- KIU-s szérumokkal történő inkubációt követően. A szérumok azon csoportjának, mely pozitív eredményeket adott az ASST vizsgálat során, 92.5 %-a (37/40) szintén pozitív lett a CD63 vizsgálatban az D_A bazofiljein tesztelve a szérumokat. Az ASST+ szérumok 50 %-a (20/40) adott pozitív CD63 teszt eredményeket abban az esetben, amikor a szérumokat a D_{NA} sejtjeivel inkubáltuk. Mindkét donor bazofiljeinek felszínén az ASST+ krónikus urticariás szérumokkal történő stimuláció jóval nagyobb mértékű bazofil aktivációs marker (CD63) expressziót eredményezett ($P < 0.05$), összehasonlítva az ASST- krónikus urticariás szérumokkal végzett stimuláció eredményeivel (20. ábra). SLE-ben és DM-ben szenvedő betegek széruma nem indukált CD63 expressziót a donor sejteken.

| | D_A | | | | D_{NA} | | | | D_A vs D_{NA} |
|------------|----------------------|---------------------|-----|-----|-----------------------|---------------------|-----|-----|--|
| | HR | HR (%) | HR+ | HR- | HR | HR (%) | HR+ | HR- | HR |
| | n | Median; (IQ) | n | n | n | Median; (IQ) | n | n | P érték |
| Összes KIU | 72 | 14,83 (3,4-66,90) | 37 | 35 | 72 | 5,76 (3,15-18,11) | 23 | 49 | 0,01 sz. |
| ASST+KIU | 40 | 57,59 (19,48-86,11) | 34 | 6 | 40 | 10,89 (4,93-48,43) | 22 | 18 | <0,01 sz. |
| ASST+KIU | 32 | 3,49 (1,30-9,64) | 3 | 29 | 32 | 3,75 (2,23-5,44) | 1 | 31 | 0,74 nsz. |
| CD63+KIU | 41 | 63,29 (20,34-86,63) | 36 | 5 | 20 | 47,94 (26,83-78,41) | 19 | 1 | 0,32 nsz. |
| CD63+KIU | 31 | 3,14 (1,27-7,16) | 1 | 30 | 52 | 4,01 (2,33-6,38) | 4 | 48 | 0,44 nsz. |

14. táblázat: HR vizsgálata D_A és D_{NA} sejteken KIU-s szérumok hatására. A szérumokat ASST-el és BAT-el is vizsgáltuk, az eredményeket összevetettük (n=72, IQ – Interkvartilis tartomány (25%-75%), sz. = szignifikáns, n.sz. = nem szignifikáns).



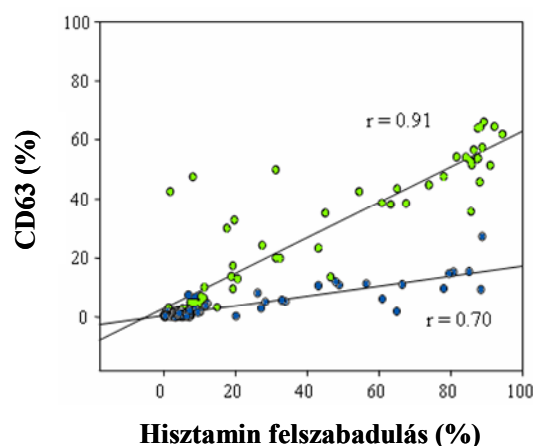
19. ábra: HR vizsgálata D_A és D_{NA} sejteken különböző betegcsoportoktól származó szérumok hatására (össz KIU n=72, ASST+ KIU n=40, ASST- KIU n=32, kontroll n=20, SLE n=15, DM n=11, *P<0,05 vs. össz KIU, **P<0,05 vs. ASST+KIU)



20. ábra: BAT vizsgálata D_A és D_{NA} sejteken különböző betegcsoportoktól származó szérumok hatására (össz KIU n=72, ASST+ KIU n=40, ASST- KIU n=32, kontroll n=20, SLE n=15, DM n=11, *P<0,05 vs. össz KIU, **P<0,05 vs. ASST+KIU)

7. Összefüggés az ASST, a BAT és a HR között (n=72)

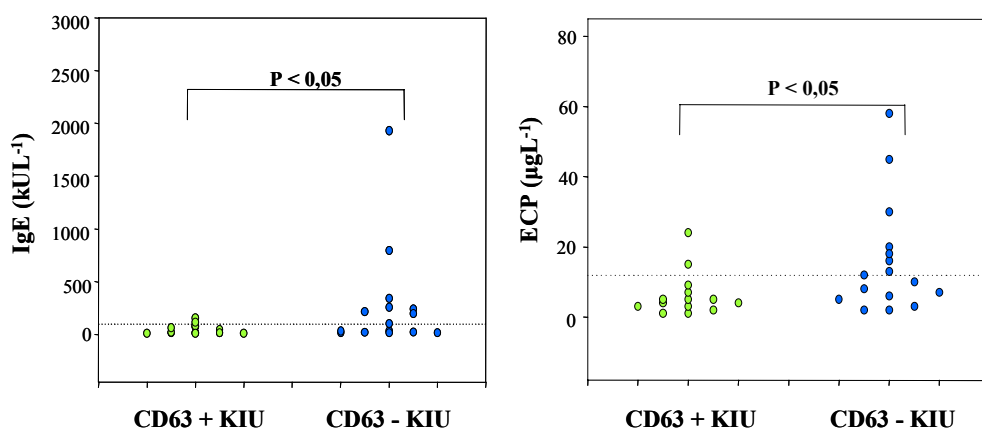
A HR vizsgálat és a BAT eredményei között szignifikáns korrelációt tapasztaltunk (D_A : $r=0.91$, D_{NA} : $r=0.70$, $P<0.001$ mindkettő esetén) az egyes betegek esetén kapott értékek vizsgálata során (21. ábra). A HR és az ASST eredményeit összehasonlítva csak abban az esetben tapasztaltunk korrelációt, amikor a D_A sejtein végeztük a vizsgálatot. Az ASST és a BAT pozitivitása között ugyancsak D_A alkalmazása során kaptunk korrelációt.



21. ábra: Mind a D_A mind a D_{NA} sejteken szignifikáns korreláció figyelhető meg a HR és BAT eredményei között (n=72, zöld karika D_A , kék karika D_{NA} , $P<0.001$ mindkettő esetén)

8. A szérum IgE és ECP szintek valamint a CD63 expresszió közötti összefüggés vizsgálata (n=30)

30 beteg szérumával elvégeztük a CD63 BAT-et és mértük a szérumokban az IgE és ECP szinteket. Az IgE szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a CD63 expressziót előidéző szérumok (n=14, IgE szint: 19 kU/l) csoportjában a CD63- (n=16, IgE szint: 151 kU/l) csoporthoz képest ($P<0,05$; 22. ábra). Az ECP szintek mérésekor is hasonló eredményeket kaptunk, a CD63+ (ECP szint: 4,5 $\mu\text{g/l}$) csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak az értékek a CD63- (ECP szint: 12 $\mu\text{g/l}$) csoporthoz képest ($P<0,05$; 22. ábra). Mérsékelt negatív korrelációt tapasztaltunk az atopiás szérummarkerek (IgE, ECP) és a D_A sejteken mért CD63 expresszió között (IgE: $r = -0,465$ D_{A1} sejteken, $r = -0,438$ D_{A2} sejteken; ECP: $r = -0,435$ D_{A1} sejteken, $r = -0,456$ D_{A2} sejteken).

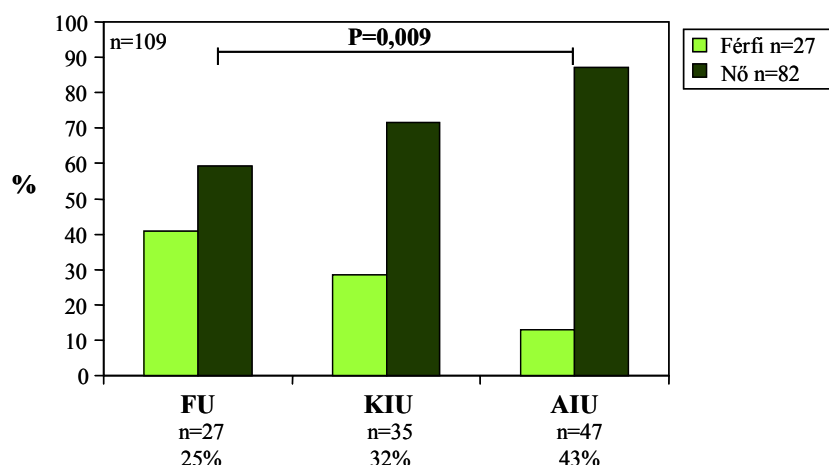


22. ábra: A CD63- KIU-s szérumok szignifikánsan magasabb IgE és ECP szintet mutattak a CD63+ KIU-s szérumokkal összehasonlítva (CD63+ KIU n=14, CD63- KIU n=16, $P < 0,05$ mindkét esetben).

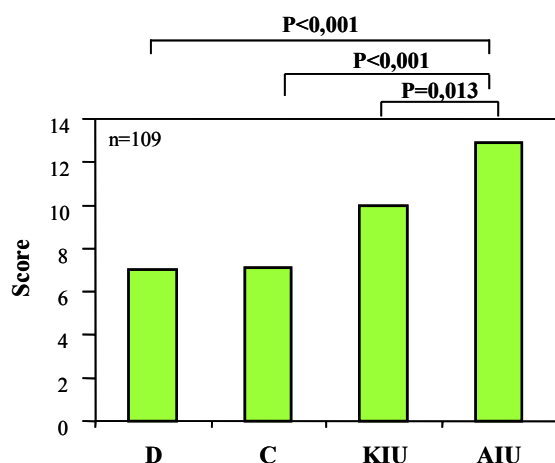
9. Klinikai tünetek súlyosságának meghatározása a krónikus urticaria 3 fő formájában, urticaria score (n=109)

A 109 vizsgált beteg közül 58 (53,2%) esetben észleltünk ASST pozitivitást, ill. 47 (43%) esetben CD63 pozitivitást. A BAT pozitivitása esetén állítottuk fel az AIU diagnózist, így összesen a betegek 43%-át (47/109) AIU-nak, 32%-át (35/109) KIU-nak és 25%-át (27/109) FU-nak diagnosztizáltuk. A FU csoporton belül 13 betegnek szimptómás dermografizmusa (urticaria factitia, D), 9 betegnek kolinerg urticariája (C), 3 betegnek késői nyomási urticariája és 2 betegnek hideg urticariája volt. A krónikus urticariás betegek nő/férfi aránya 3:1 volt (82/27), ami statisztikailag szignifikáns női dominanciát jelentett ($P=0,02$). A nő/férfi arány az AIU betegcsoportban 6,9:1 (41/6), a KIU csoportban 2,5:1 (25/10) és a FU csoportban 1,5:1 (16/11) volt. Szignifikáns különbséget a nemek megoszlásában csupán az AIU és FU csoportot összehasonlítva tudtunk kimutatni ($P=0,009$; 23. ábra).

A betegeknél a 7. táblázatban mutatott módosított Breneman score alapján meghatároztuk az urticaria súlyosságát. Az AIU betegek totál urticaria score indexe 12,89, a KIU betegeké 9,98 volt. A FU csoporton belül csak a D és C betegeknél számítottunk urticaria score értéket, mivel ezen csoportok tünetei tekinthetők folyamatosan fennállónak (hetente több alkalommal megfigyelhető csalánkiütés). A D betegeknél 7,03, a C betegeknél 7,12 score értéke volt (27. ábra). A betegcsoportok között szignifikáns különbséget demonstráltunk az AIU és KIU ($P=0,013$) valamint az AIU és D és C ($P < 0,001$ mk. esetben) betegek között a totál urticaria score értékek összehasonlításakor, de nem volt szignifikáns a különbség a KIU és D és C ($P=0,253$, $P=0,135$) betegek között (24. ábra).



23. ábra: Nemek megoszlása a krónikus urticaria egyes alcsoportjai között.



24. ábra: Totál urticaria score értékek a krónikus urticaria egyes alcsoportjaiban.

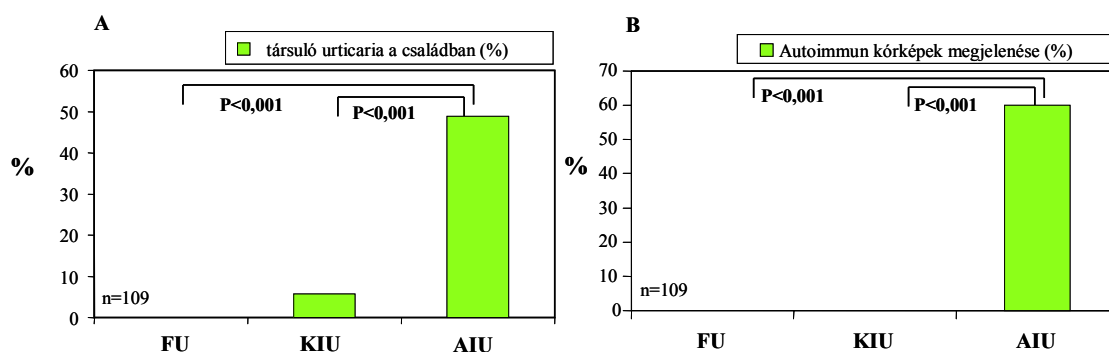
10. Társuló betegségek és autoantitestek előfordulása AIU, KIU és FU csoportokban (n=109)

A betegek által kitöltött nemzetközi kérdőív alapján vizsgáltuk a társuló betegségek előfordulását. A betegek 23%-a (25/109) számolt be arról, hogy családjában valamely urticaria típus már előfordult, melyek közül FU-t, gyógyszer okozta akut urticariát és KIU-t említettek leggyakrabban. Az AIU betegek 48,9% (23/47), a KIU betegek 5,7% (2/35), míg a FU betegek 3,7%-a (1/27) jelezte, hogy családjában csalánkiütéses epizódok fordultak elő. Szignifikáns eltérést észleltünk az AIU és KIU ($P<0,001$), és az AIU és FU ($P<0,001$) betegek között (25/A ábra). Összehasonlítottuk továbbá a betegeink családi anamnézisében előforduló allergiás kórképek gyakoriságát. Eredményeink szerint a betegek 11%-a (12/109) gyógyszerallergiát, 5,5%-a (6/109) asthma bronchialét, 9,1%-a (10/109) allergiás rhinitist és

2,7%-a (3/109) ekzemát említett. A betegségek előfordulási gyakorisága a három betegcsoportban közel azonos volt.

A betegek 22%-a (24/109) említett autoimmun megbetegedést anamnézisében. Az AIU betegek 51%-nak (24/47) kórelőzményében szerepelt valamely más autoimmun betegség, míg a KIU és FU betegek anamnézisében nem fordult elő ilyen betegség. Ez a különbség szignifikáns volt a három betegcsoport között ($P<0,001$) (25/B ábra). A leggyakrabban előforduló autoimmun betegségek: autoimmun thyreoiditis (44,6%, 21/47), rheumatoid arthritis (4,2%, 2/47) és a vitiligo (17%, 8/47) voltak.

Az AIU betegek esetében a pajzsmirigy ellenes antitestek szignifikánsan magasabb szintjét észleltük, összehasonlítva a többi krónikus urticaria alcsoporttal. A teljes krónikus urticariás beteg csoporton belül 11%-ban (12/109), míg az AIU betegek 23%-ában (11/47) detektáltunk pajzsmirigy ellenes autoantitesteket (a-TG, a-TPO). A KIU csoporton belül egy betegnél találtunk a-TPO pozitivitást (2,8%, 1/35), míg a FU betegek szérumában nem tudtunk autoantitesteket kimutatni. A pajzsmirigy ellenes autoantitestek (a-TG és a-TPO) az AIU betegeknél ezek alapján szignifikánsan gyakrabban ($P<0,001$) fordultak elő, mint a másik két krónikus urticariás betegcsoportban. Egyéb autoantitestek (ENA, AECA) vonatkozásában a krónikus urticariás csoportok között nem találtunk szignifikáns különbséget (15. táblázat).



25. ábra: A családi anamnézisben előforduló urticaria gyakorisága (A) illetve az egyéni anamnézisben előforduló autoimmun kórképek gyakorisága (B).

| | a-TG | a-TPO | a-ENA | AECA |
|-----------------|----------|---------|----------|----------|
| Fizikai n=27 | 0 | 0 | 1 (3,7%) | 2 (7,4%) |
| Idiopátiás n=35 | 0 | 1 (2,8) | 2 (5,7%) | 2 (5,7%) |
| Autoimmun n=47 | 3 (6,3%) | 8 (17%) | 2 (4,2%) | 2 (6,3%) |

15. táblázat: Autoantitestek előfordulási gyakorisága.

11. Az AIU, KIU és FU összehasonlítása a terápiára mutatott válasz szempontjából (n=109)

Az antihisztamin terápia (a második generációs monoterápia, első generációs H1, illetve H2 antagonisták kombináció) a krónikus urticariás betegek 45%-ában (49/109) bizonyult hatékonynak. A FU betegek 70,3%-a (19/27), a KIU betegek 68,6%-a (24/35) míg az AIU betegek mindössze 12,8%-a (6/47) reagált az első lépésként alkalmazott terápiára. A második lépésként szisztémás kortikoszteroid terápiát alkalmaztunk a KIU-s betegek 31,4%-ánál (11/35) és az AIU betegek 87,2%-ánál (41/47). Ezen terápia hatékonynak bizonyult a KIU betegek 63,6%-ánál (7/11) és az AIU betegek 53,6%-ánál (22/41). 19 AIU-s betegnél volt szükség cyclosporin adására, ennek hatására 15 beteg tünetmentessé vált (78,9%), 4 beteg nem reagált a kezelésre (16. táblázat).

| | Antihisztamin kezelés effektív | Kortikoszteroid kezelés effektív | Cyclosporin A kezelés effektív |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| FU (n=27) | 19/27 (70,3%) | - | - |
| D (n=13) | 10/13 (77%) | - | - |
| C (n=9) | 7/9 (77,7%) | - | - |
| KIU (n=35) | 24/35 (68,57%) | 7/11 (63,6%) | - |
| AIU (n=47) | 6/47 (12,8%) | 22/41 (53,6%) | 15/19 (78,9%) |

16. táblázat: Az egyes terápiás lépésekre adott válaszreakció.

V.3.2. Megbeszélés

Citokin termelés vizsgálata krónikus idiopátiás és autoimmun urticariában

Az utóbbi évtizedben számos klinikai megfigyelés és kísérletes adat bizonyította, hogy a KIU csoporttól elkülöníthető egy új krónikus urticaria csoport, az AIU. Több bizonyíték szól amellett, hogy az AIU valódi antitest mediált autoimmun betegség. A betegek szérumával a tünetek reprodukálhatóak egészségeseken is (ASST), a funkcionális antitestek szérumszintje korrelál a betegség súlyosságával, az antitestek eltávolítása után (plazmaferezis) tünetmentesednek a betegek, bizonyos HLA asszociáció figyelhető meg, illetve gyakran társul egyéb autoimmun betegségekkel (215-217, 221-223). Számos autoimmun betegségben figyelhető meg a T1 és T2 sejtek működésének illetve az általuk termelt citokin szintek egyensúlyának felborulása, mely patogenetikai szerepet is játszik a betegségek kialakulásában. Kezdeti vizsgálatainkban az irodalomban elsőként, arra kerestünk választ,

hogyan kimutatható-e jellegzetes T1 vagy T2 túlsúly a KIU-s vagy AIU-s betegek perifériás vérében.

Sejtes vizsgálataink során először a limfocita szubpopulációk meghatározását végeztük el perifériás vérből. Az irodalomban Malet és mtsai szignifikánsan csökkent CD8⁺ T limfocita számot észlelték a KIU-s betegek perifériás vérében, amit mi nem tudtunk megerősíteni (386). Saját vizsgálatainkban a beteg populációban nem volt különbség a CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ és CD19⁺ T és B sejtek eloszlásában a kontroll egyénekhez képest. Ezt követően a CD3⁺ T limfocitákon belül az aktivált T sejtek százalékos arányát vizsgáltuk. A HLA-DR-t expresszáló T limfociták arányának szignifikáns emelkedését tapasztaltuk a beteg populációban az egészséges kontrollhoz képest, míg a korai aktivációs marker (CD69) esetén nem találtunk eltérést.

A T sejtek intracitoplazmatikus citokin termelését KIU-s beteg bőrmintáiban in situ hibridizációs módszerrel először Ying és mtsai vizsgálták (226). Eredményeik szerint nem tudtak sem Th1, sem Th2 dominanciát kimutatni, hanem Th0 típusú citokin mintázatot detektáltak, mivel mind az IL-4 és IL-5, mind az IFN- γ mRNS expresszió emelkedett volt KIU-s mintákban a normál kontrollhoz képest. A perifériás vér mononukleáris sejtek citokin termelését nem vizsgálták. Saját eredményeink alapján először számoltunk be arról, hogy a perifériás vér T sejtekben sem mutatható ki domináns T1 vagy T2 citokin termelés, hiszen mind CD4⁺, mind CD8⁺ T sejtek esetén szignifikánsan csökkent IFN- γ , a CD4⁺ T limfociták esetében pedig szignifikánsan csökkent IL-4 expressziót is tapasztaltunk a KIU-s betegekben a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ugyanakkor az IL13-t expresszáló CD4⁺ és CD8⁺ T limfociták száma, valamint az IL-4 termelő CD8⁺ sejtek száma nem mutatott szignifikáns emelkedést a kontroll csoporthoz képest. Ezzel párhuzamosan azonban, jelentősen emelkedett mind a CD4⁺ Th, mind a CD8⁺ Tc limfociták IL-10 termelése KIU-s betegekben. Az IL-10 egy immunreguláló citokin, melyet a Tr1 sejtek termelnek és egyaránt gátló hatást fejt ki a Th1 és Th2 típusú sejtek proliferációjára és citokin termelésére. Eredményeink birtokában elképzelhető, hogy a fokozott IL-10 termelés következtében vált mind a Th, mind a Tc limfociták IFN- γ termelése nagymértékben gátolttá. Az IL-10 gátló hatására a Th2 sejtekben is csökkent az intracelluláris IL-4 expresszió. A CD8⁺ sejtek IL-4 expressziójának emelkedése talán a csökkent IFN- γ szinttel magyarázható, hiszen az IFN- γ képes gátolni az IL-4 szekrécióját, de egy csökkent IFN- γ szint ezt a gátló hatást már nem képes kifejteni. Irodalmi adatok szerint az IL-10 gátló hatása az IL-13 termelődésére nem jelentős, ez a tény lehet magyarázata az emelkedett IL-13 szintnek. Közleményünkkel

egyidőben jelent meg Ferrer és mtsai tanulmánya, melyben saját eredményeinket megerősítve, KIU-s betegek perifériás vér T sejteken végzett vizsgálataik során nem találtak különbséget az IFN- γ /IL4 termelő T1/T2 sejtek arányában az uticariás és a kontroll csoport között (387).

Vizsgált betegeink mindegyikében elvégeztük az ASST-et, a CD63 BAT még nem állt rendelkezésükre. A 22 betegből 14 betegnél tapasztaltunk pozitív válaszreakciót, és 8 beteg ASST negatív volt. Ezek után összehasonlítottuk a pozitív és negatív betegcsoportok adatait. Az eredmények tanulmányozása során nem találtunk érdemi eltérést a két csoportban mért CD marker értékek és citokin expressziós értékek tekintetében, bár a két csoport betegszáma nem volt elég nagy szignifikancia számolásához.

A CD63 BAT alkalmazhatóságának vizsgálata az autoimmun urticaria diagnosztikájában

Az AIU laboratóriumi diagnózisa nehéz, de nem csupán a rendelkezésre álló laboratóriumi módszerek hiányosságai miatt, hanem azért is mivel az AIU betegcsoport heterogén. Sabroe és mtsai 5 csoportot különítettek el a szérumok reaktivitása és a kimutatható antitestek alapján. Funkcionális anti Fc ϵ RI α antitest pozitív szérumok csoportját, nem funkcionális anti Fc ϵ RI α antitestet tartalmazó szérumok csoportját, anti-IgE antitest pozitív szérumok csoportját, hízósejt specifikus, de nem immunglobulin természetű hisztamin felszabadító faktort tartalmazó szérumok csoportját és olyan szérumokat különböztettek meg, amelyek egyik csoportba sem tartoztak (230). Jelenleg a bazofil HR standard módszernek számít a betegség diagnosztizálásakor az autoantitestekkel rendelkező betegek azonosításában, de a módszer kivitelezése nehéz, számos laboratóriumban nincsenek meg a feltételek a rutinszerű alkalmazáshoz. Célunk egy új funkcionális teszt kifejlesztése volt, mely egy bazofil aktivációs marker, a CD63 molekula kimutatásán alapszik. A CD63 molekula az aktivált bazofil sejtek felszínén de novo megjelenő marker, nyugvó bazofileken csekély mértékű expresszióját tapasztaljuk.

Elsőként Wedi és munkatársai alkalmazták a bazofil CD63 felszíni expressziós tesztet 40 beteg esetén az AIU diagnosztikájában (388). A kapott eredményeket összehasonlították a bazofil HR vizsgálat, és a szulfidoleukotrién (SLT) termelés eredményeivel. A kísérlet során nem tapasztaltak pozitív korrelációt a HR, a CD63 expresszió és az SLT termelés között. Végül arra a megállapításra jutottak, hogy a CD63 felszíni expresszió és az SLT termelés vizsgálata nem használható diagnosztikai markerként az AIU diagnosztikájában.

Ezzel szemben munkacsoportunk elsőként alkalmazta sikeresen a CD63 BAT egy módosított formáját az AIU diagnosztikájában. Beszámoltunk arról, hogy a módosított CD63 expressziós vizsgálat előzetes IL-3 stimuláció nélkül szignifikáns korrelációt mutatott a „gold

standardnak” számító HR vizsgálattal mind D_A , mind D_{NA} bazofil sejteken, az ASST-el pedig szenzitizált D_A bazofil sejteken. A mi eredményeink illetve Wedi és kutatócsoportja által kapott eredmények közötti különbség a laboratóriumi eljárások közti különbözőségekből származhat. Wedi és mtsai a kísérletekben teljes vért használtak, a bazofil granulocitákat pedig IL-3-mal stimulálták. Mi a teljes vér helyett izolált leukocitákat teszteltünk, melynek következtében feltehetőleg elkerültük egyéb szérum faktorok hatását, az IL-3-at pedig nem használtuk a kísérleteink során. Ugyanakkor szenzitizált D_A bazofil sejteket alkalmaztunk, mivel az irodalomból ismert, hogy atopiás egyének perifériás vérében nagyobb számban vannak bazofil sejtek, melyek felszínén fokozott az Fc ϵ RI szám és a sejtek aktivált állapotban vannak (389-391). Vizsgálataink ezt megerősítették, mivel kimutattuk, hogy a D_A sejtek az Fc ϵ RI-n keresztül ható specifikus stimulusokra (anti-IgE antitest, IB+ szérum) sokkal erőteljesebb reaktivitást mutattak, mint a D_{NA} sejtek. A G protein kapcsolt receptorokon keresztül ható FMLP vagy MCP-1 stimulusok esetében nem volt ilyen különbség a donor sejtek között.

Rendszerünk nagyobb mértékű specificitását az is alátámasztotta, hogy kísérleteinkben a DM-ben és SLE-ben szenvedő betegek, továbbá az egészséges kontrollok széruma nem indukált CD63 expressziót a bazofil sejtek felszínén, míg Wedi és munkatársai az általuk alkalmazott módszerrel nagyobb mértékű CD63 expressziót mutattak ki a kontroll szérumok inkubációját követően a bazofil sejtek felszínén.

Egy közelmúltban megjelent közleményben De Swerd szintén jó korrelációt talált az ASST és a CD63 expressziós vizsgálat között krónikus urticariás betegekben (392). Kimutatta, hogy a szérumok IgG frakciója felelős a CD63 expresszióban megnyilvánuló aktivációért és javasolta az ASST és a CD63 expressziós teszt együttes alkalmazását az AIU diagnosztikájában.

A CD63 expresszió alapuló BAT nem csupán az AIU diagnosztikájában használható eredményesen. Azonnali típusú hiperszenzitivitási reakciók vizsgálatában is kezd elterjedni az alkalmazása, többek között méh és darázscsípés, gyógyszer, latex, pollen és élelmiszer allergiákban (393-395). Ezen vizsgálati rendszerekben azonban fontos tudni, hogy nem alkalmaznak donor sejteket, hanem a betegtől származó bazofil sejteket kell összehozni egy rendszeren belül az adott allergénnel és mérni a sejtfelszíni CD63 expressziót. Basotest néven forgalomban is kaphatók ezen tesztek. Egy ilyen rendszerben, ahol fűpollenre allergiás betegeket vizsgáltak, Sainte-Laudy és mtsai jó korrelációt találtak a HR és a CD63 expressziós vizsgálat között (396).

A különböző tanulmányokban a krónikus urticariás szérumok 27-52%-ban bizonyultak pozitívnak a HR vizsgálatokban, a kiválasztott beteg populáció és a donor bazofilok függvényében (230). A mi kísérleti munkánkban az D_A bazofiljaiból a krónikus urticariás szérumok 51%-a váltott ki nagy mennyiségű hisztamin felszabadulást, míg a D_{NA} bazofiljait a szérumok 32%-a aktiválta. A D_A és D_{NA} bazofil sejtjeinek reaktivitásában megfigyelhető különbséget Wedi és munkacsoportja szintén megfigyelte (388). A D_{NA} IgE-vel gyengén szenzitizált sejtjei a szérum IgE-vel kompetitív és nem-kompetitív anti Fc ϵ RI α antitestjeivel reagálnak, míg az D_A IgE-vel erősen szenzitizált sejtjei mind az anti IgE, mind a nem kompetitív anti Fc ϵ RI antitestekkel kapcsolatba lépnek. Ezt alapul véve az általunk alkalmazott két donoron kapott HR eredmények közötti különbségek két dologgal magyarázhatók. Az egyik lehetséges magyarázat az lenne, hogy a krónikus urticariás betegek széruma nagy mennyiségű anti IgE antitestet tartalmaz. Ez azonban nem valószínű, mert különböző tanulmányok azt írták le, hogy a krónikus urticariás betegeknek csupán 9%-a rendelkezik funkcionális anti IgE antitestekkel, és a legtöbb autoantitest a nagy affinitású IgE receptorhoz kötődik (230). A másik, sokkal valószínűbb magyarázat, hogy az D_A bazofil sejtjei erősen aktivált állapotban vannak, ezért a sejtek fokozottabb mértékben szabadítanak fel hisztamint és egyéb mediátorokat (397).

Tanulmányainkban az ASST csak akkor mutatott jó korrelációt a HR és BAT vizsgálatokkal, ha szenzitizált D_A sejteket használtunk. A HR teszt és az ASST közötti korrelációt vizsgáló tanulmányok eredményei ellentmondásosak. Egyes szerzők egyetértenek abban, hogy az ASST pozitív betegek szérumának csupán egy része képes hisztamin felszabadulást kiváltani, ami az esetleges álpozitív ASST eredményekből ered (230,231,398). Egy másik magyarázat az lehet, hogy a funkcionális tesztek szenzitivitása nem megfelelő. Kísérleteink során a HR mérés és az ASST jól korrelált egymással, ha az *in vitro* teszt szenzitivitását egy erősen szenzitizált atopiás donor sejtjeinek alkalmazásával növeltük. Asero és kollégái szintén fokozták a HR vizsgálat érzékenységét egy másik megközelítés segítségével. Hat különböző nem atopiás donor sejtet (három bazofil granulocitát és három hízósejtet) használva 94%-os pozitivitást kaptak az ASST és a HR közötti összefüggés vizsgálatakor (232).

A szérumok IgE és ECP szintjét, mint atopiás markerek szintjét, összehasonlítottuk a szérumokkal történt inkubáció hatására bekövetkező CD63 expresszióval. Mérsékelt negatív korrelációt tapasztaltunk az IgE és ECP mennyiség és a CD63 expresszió között. Mindkét marker szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a CD63+ és ASST+ csoportban. Wedi és munkacsoportja szintén vizsgálta a fent tényezők közötti összefüggést, de nem mutattak ki

szignifikanciát. Ez is a két BAT közötti különbségekkel magyarázható. A magasabb ECP szint és a negatív ASST közötti összefüggést megerősítik Sabroe eredményei is, miszerint a negatív ASST-t adó krónikus urticariásoktól vett biopsziás anyagban magasabb az aktív eozinofilek száma (191). Eredményeink alátámasztják azt a feltevést, hogy az eozinofil aktiváció nem játszik szerepet az AIU patogenezisében.

Végeredményben az általunk alkalmazott módosított CD63 BAT megbízható funkcionális tesztnek tűnik az AIU diagnosztikájában, mely jó összefüggést mutat a HR vizsgálattal. A két funkcionális teszt közötti korreláció erősebb, amennyiben mindkét teszthez erősen szenzibilizált D_A sejteit használjuk, de D_{NA} sejteken is fenn áll. Az ASST és a két funkcionális módszer összehasonlítása során akkor kaptunk jó egybeesést, ha a funkcionális tesztek D_A sejteken végeztük. Eredményeink alapján a szűrővizsgálatként végzett ASST megerősítő vizsgálatként javasoljuk a BAT alkalmazását az AIU diagnosztikájában, mely alternatívaként szolgálhat a HR mellett, azon laboratóriumok számára, ahol az áramlási citometria módszere rendelkezésre áll. BAT AIU diagnosztikájában való alkalmazásának pozitív megítélését bizonyítja, hogy a legújabb nemzetközi közlemények is elfogadják és alkalmazzák (309,400).

Klinikai vizsgálatok a krónikus urticaria alcsoportjaiban

További vizsgálataink célja a BAT klinikai gyakorlatban való alkalmazhatóságának felmérése volt. 109 betegnél a krónikus urticaria leggyakoribb formáit hasonlítottuk össze (FU, KIU és AIU) a betegség súlyosságát, kísérőbetegségek meglétét, autoantitestek jelenlétét és az alkalmazott terápiás protokoll hatékonyságát figyelembe véve úgy, hogy az AIU a BAT pozitivitás alapján lett diagnosztizálva. Az irodalomban az AIU-t általában a HR assay eredményei alapján diagnosztizálják (392,401).

Az irodalomban a szerzők többsége egyetért abban, hogy a FU aránya a krónikus urticariás betegek között 30-35%, míg az AIU 27-35%-ot (183,402) képvisel. Vizsgálatunkban a krónikus urticariás betegek 43%-ka AIU, 32%-a KIU és 25% FU beteg. Az AIU magasabb és a FU csoport alacsonyabb százalékos aránya betegeink között azzal magyarázható, hogy az enyhébb urticaria formákat a háziorvosok és a bőrgyógyászati ambuláns szakrendelések sikeresen kezelik. A súlyosabb vagy terápia rezisztens urticaria eseteket utalják döntően a Bőrgyógyászati Klinikánk (harmadik ellátási szint) Allergológiai Szakrendelésére.

Vizsgálatunkban 75%-os női dominanciát (3:1) figyeltünk meg a krónikus urticariás betegek között, és egy még kifejezettebb női dominanciát találtunk az AIU csoporton belül (87,2%). Eredményeinket számos irodalmi adat erősítette meg. Többek között Sabroe és mtsai 61%-os (66/107) női dominanciát írtak le az autoantitesttel rendelkező csoporton belül (191).

A betegség súlyosságának megítéléséhez a Breneman és mtsai által bevezetett pontrendszert alkalmaztuk kisebb módosítással annak érdekében, hogy alkalmazhatóvá váljon a FU-s esetekben is (305). A FU csoportban az urticaria scoret nehéz alkalmazni, mivel nem mindegyik FU esetben jelentkeznek folyamatosan a tünetek. Emiatt csak a D és C betegeknel számoltunk score értékeket, melyek hasznos információt nyújtottak arról, hogy a betegség mennyire befolyásolja az életminőséget. Eredményeink alapján az AIU-s betegek összpontszáma szignifikánsan súlyosabb volt a KIU-s, illetve D és C betegekénél. Sabroe és mtsai közleménye alapján, a szérum autoantitestekkel rendelkező, HR+ betegek szignifikánsan magasabb urticaria score-ral jellemezhetők, de a szerzők csak az AIU-s és a KIU-s betegeket vetették össze. Ezen eredmények is a BAT megbízhatóságára utalnak, hiszen az autoimmun és nem autoimmun csoport súlyossága között szignifikáns különbség adódott akkor is ha a BAT és akkor is ha a HR alapján lettek szétválasztva a csoportokat. Nettis és mtsai azonban az ASST alapján elkülönített csoportok között nem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni (403). Az irodalomban először hasonlítottuk össze a FU-s betegek adatait AIU-s és KIU-s betegek adataival. Bár a totál urticaria score magasabb volt a KIU csoportban, a KIU és D és C betegek totál urticaria score értékei között nem észleltünk szignifikáns különbséget. Ennek hátterében szintén az állhat, hogy Klinikánkra csak a legsúlyosabb FU-s eseteket irányítják.

Több közlemény számol be AIU-s betegekben végzett autoantitest kimutatásról. Leggyakrabban antithyreoida antitesteket (a-TG, a-TPO) találtak, de néhány tanulmányban ENA, cardiolipin, béta-2 glicoprotein, rheuma factor, endothelsejt és myeloperoxidase ellenes antitesteket is kimutattak krónikus urticariás betegeknel (404-406). Összhangban ezen eredményekkel vizsgálatunkban szintén szignifikánsan gyakrabban találtunk pajzsmirigy ellenes antitesteket az AIU csoportban szemben a másik két alcsoporttal. Másfelől vizsgálatunkban nem tudtunk szignifikánsan magasabb ENA vagy endothel ellenes antitest szintet kimutatni a krónikus urticariás betegek körében.

Caproni és Sabrone szintén vizsgálták a krónikus urticariás betegek családi és autoanamnézisében az atopiás és autoimmun megbetegedések, valamint az urticaria előfordulását, de nem tudtak kimutatni szignifikáns eltérést az autoantitesttel rendelkező, illetve nem rendelkező betegek között (191,407). Saját felmérésünkben az AIU-s betegek családi anamnézisében szignifikánsan magasabb urticaria, egyéni anamnézisében

szignifikánsan magasabb autoimmun betegség előfordulási gyakoriságot találtunk összehasonlítva a KIU-s és FU-s alcsoportokkal. Az atopiás megbetegedések és a gyógyszerallergia tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a három alcsoport között. A krónikus urticariás betegek 11%-ánál szerepelt gyógyszerallergia az anamnézisben, míg Humphreys és mtsai 9,8%-os gyakoriságról számoltak be hasonló betegcsoportban (406).

A krónikus urticariás betegek kezelésében három lépcsős protokollt alkalmaztunk (231,409, 410). Minden urticariás beteg első lépésben antihisztamint (kezdetben monoterápia, majd szükség esetén kombinált kezelés) kapott, melyre a betegek 45%-a jól reagált. A cetirizine monoterápia, ill. a cetirizine és H₂ antihisztamin kombinációs terápia hatékonyságát számos közlemény tárgyalta. Handa és mtsai szerint 97 KIU beteg 88,4%-ánál bizonyult hatékonynak a cetirizine monoterápia (51,9% vált tünetmentessé, 36,5%-nál részleges javulást tapasztaltak) (410). Másfelől a Harvey és mtsai által közölt eredmények alapján a hydroxizine-cimetidine kombináció a KIU-s betegek 58%-ánál bizonyult hatékonynak (411). A különböző antihisztamin terápiák hatékonyságát azonban még nem vizsgálták a krónikus urticaria három alcsoportjára lebontva. Vizsgálatunkban az első vonalbeli kezelés a KIU-s betegek 68,6%-ában, a FU-s betegek 70,3%-ában és az AIU-s betegek 12,8%-ában bizonyult hatékonynak. Ezek alapján az AIU nemcsak a krónikus urticaria legsúlyosabb formájának számít, de egyúttal legkevésbé reagál a hagyományos antihisztamin terápiára.

Azoknál a KIU-s és AIU-s betegeknél, akiknél az első vonalbeli kezelés inefektívnek bizonyult, per os kortikoszteroid kezelést indítottunk. Annak ellenére, hogy nem készült kettős vak, placebo kontrollált vizsgálat a kortikoszteroidok eredményességéről a krónikus urticariában, hatékonyságuk vitathatatlan e betegcsoportban (412). Nincs általánosan elfogadott protokoll a kortikoszteroid adását illetően, de általánosságban elmondható, hogy a H₁ receptor antagonistákat folytatni kell a szteroid kezelés megkezdése után is, illetve tartózkodni kell az elhúzódó szteroid kezeléstől annak lehetséges mellékhatásai miatt. Az orális kortikoszteroidokra nem reagáló 19 AIU-s betegnél cyclosporin A terápiát indítottunk, melyre 78,9%-uk vált tünetmentessé. Ezzel a gyógyszerrel kapcsolatban Greaves és mtsai 75%-ot meghaladó eredményességről számoltak be, a későbbiekben a terápia befejezése után a betegek harmada maradt remisszióban, egyharmadánál enyhe, míg a maradék harmad esetében súlyos relapszus alakult ki (224,413).

Amennyiben tehát a HR helyett a CD63 BAT-et alkalmaztuk az AIU-s betegek diagnosztikájában, a korábbi vizsgálatok eredményeivel összhangban az AIU a legsúlyosabb krónikus urticaria formának bizonyult. Az AIU-s betegek családjában más urticaria formák, míg egyéni anamnézisükben egyéb autoimmun betegségek előfordulása bizonyult

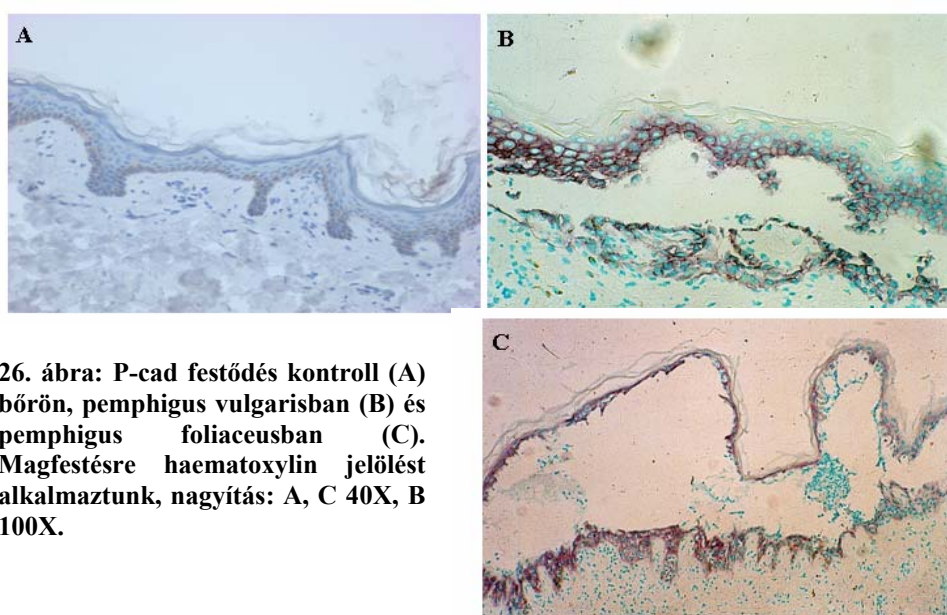
szignifikánsan gyakoribbnak. Másfelől a KIU és FU alcsoportok összesített urticaria pontszámában és antihisztamin terápiára adott válaszában nem volt szignifikáns különbség kimutatható.

V. 4. Adhéziós molekulák – Pemphigus

V.4.1. Eredmények

1. P-cadherin immunhisztokémiai kimutatása pemphigusban (n=14)

Pemphigus vulgarisban és foliaceusban szenvedő betegek lézionális bőrmintáiban a P-cad nem csupán a bazális és szuprabazális keratinocita sejtsorok felszínén volt kimutatható, ami a normál bőrre jellemző, hanem a magasabb epidermális rétegekben is, melyek a bulla tetején helyezkedtek el (26. ábra).



2. Az adhéziós molekulák kifejeződésének vizsgálata kontroll HaCaT keratinociták tenyésztési idejének, azaz a proliferációs és differenciáltsági állapotának függvényében

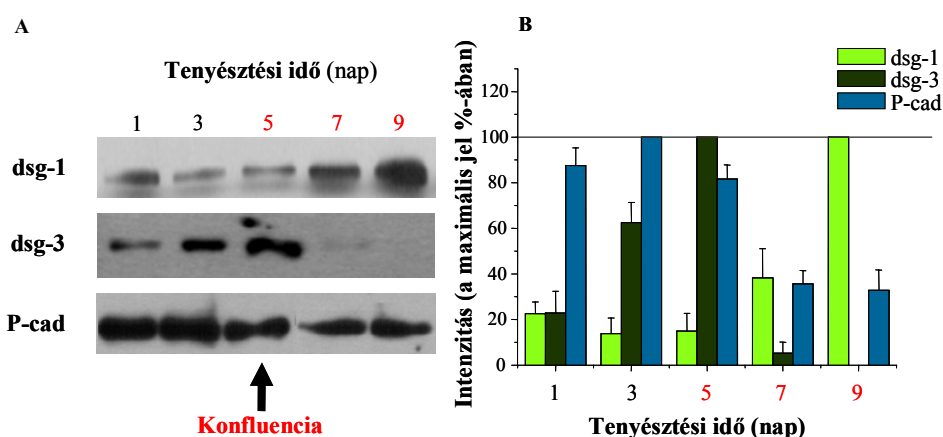
A HaCaT keratinociták egészen addig gyorsan osztódnak, míg el nem érik a konfluencia állapotát (vagyis míg teljesen be nem nővik a tenyésztőedényt), majd beindul a nagy sejtdenzitás-indukálta differenciálódási program és az osztódás üteme lelassul (414).

Kísérleteink során ezért először az adhéziós molekulák kifejeződését kontroll HaCaT sejtek tenyésztése során vizsgáltuk. A sejteket 9 napon keresztül kétnaponta összegyűjtöttük,

majd az adhéziós molekulákra nézve Western blotot és kvantitatív denzitometriás analízist végeztünk. Megállapítottuk, hogy a különféle sejtfelszíni adhéziós molekulák kifejeződése eltérő módon változott. Az epidermisben a differenciált felső rétegekben kifejeződő *dsg-1* alacsony expressziós szintet mutatott a proliferáló, szubkonfluens kultúrákban. A molekula kifejeződése ugyanakkor drámai módon megemelkedett a nagy sejtdenzitás, azaz a konfluencia (5. tenyésztési nap) elérésekor beinduló differenciálódás során (27. ábra).

Ezzel ellentétben, a *dsg-3*, mely az epidermis bazális és szuprabazális rétegeiben található, egyre nagyobb expressziót ért el a proliferáció intenzitásának fokozódásával (1-5. napok között), míg ezen adhéziós fehérje praktikusán nem volt detektálható a differenciálódó keratinocitákban. Ehhez hasonlóan (bár eltérő mintázatot mutatva), a P-cad szintje ugyancsak a proliferáló sejtekben volt a legnagyobb, ugyanakkor kifejeződése jelentősen csökkent a posztkonfluens tenyészetekben (27. ábra).

Adataink alapján úgy tűnik, hogy az általunk vizsgált HaCaT sejtekben a proliferáció és differenciálódás megszabja az adhéziós molekulák kifejeződését, illetve a proliferációs és differenciálódási tenyésztési protokoll jól „utánozza” az *in vivo* állapotot, azaz a modellrendszer jól alkalmazható az adhéziós molekulák kifejeződésének *in vitro* vizsgálatára.



27. ábra Az adhéziós molekulák expressziójának változása a tenyésztési napok függvényében
A) Az adhéziós molekulák kimutatására Western blotot készítettünk. **B)** Ezt követően megmértük az egyes immunjelek denzitometriás intenzitását, majd az adott kísérletben legerősebb jel intenzitására, mint 100 %-ra normáltuk (az ábrán 3 független kísérlet átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel).

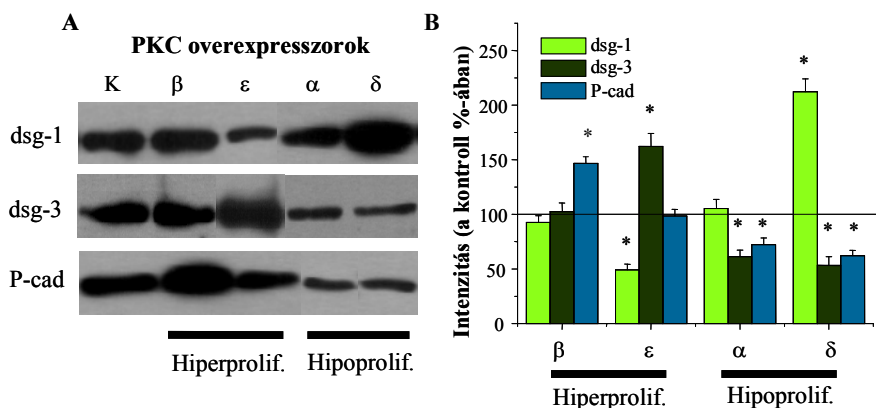
3. Az adhéziós molekulák kifejeződésének vizsgálata különféle PKC izoformákat stabilan túltermelő HaCaT keratinocitákban

Ezt követően a különféle PKC izoenzimeket túltermelő és ennek következtében jelentősen megváltozott proliferációs és differenciáltsági állapotú HaCaT sejteken vizsgáltuk

a három adhézios molekula kifejeződését. Azonos (kb. 60-70 %-os) konfluenciánál összegyűjtött sejteken végzett Western blot analízis elvégzése után azt tapasztaltuk, hogy az egyes izoenzimek jelenléte, illetve az általuk módosított növekedési jellemzők (jelentős variabilitást mutatva) differenciált módon változtatták meg az adhézios molekulák expresszióját (28. ábra).

Eszerint a hiperproliferatív, PKC β -t expresszáló keratinocitákban (a várákosoknak megfelelően) jelentősen és szignifikáns módon megnövekedett a P-cad szintje. Meglepő módon ugyanakkor azt mértük, hogy sem a dsg-1, sem a dsg-3 szintje nem változott a kontroll („üres” vektorral transzfektált) sejtek értékeihez képest. Az ugyancsak hiperproliferatív növekedésű és lecsökkent differenciáltsági állapotú PKC ϵ -t kifejező sejtekben ugyanakkor a dsg-3 szintje szignifikánsan emelkedett, a dsg-1 expressziója pedig szignifikáns módon lecsökkent, míg a P-cad kifejeződése nem változott meg a kontrollhoz képest. A hipoproliferatív, magasan differenciált sejtek vizsgálata során kiderült, hogy a PKC α -t overexpresszáló sejtekben a dsg-3 és P-cad kifejeződése szignifikánsan csökkent a kontroll sejtekéhez képest, míg a dsg-1 szintje lényegesen nem változott. A proliferációs állapot alapján felállított „várákosokhoz” leginkább hasonlító képet az ugyancsak nagy differenciáltsági állapotú PKC δ -t kifejező sejtek vizsgálatakor kaptuk. Megállapítottuk, hogy a dsg-1 expressziója fokozódott, míg ezzel ellentétben a dsg-3 és P-cad szintje csökkent a kontrollhoz képest.

Ezen eredmények alapján úgy tűnik, hogy a különféle adhézios molekulák kifejeződését nemcsak a proliferációs és differenciáltsági állapotban, de a különféle PKC izoformák overexpressziójának következtében kialakuló módosulások is befolyásolják. Eredményeink emellett azt is sugallják, hogy az adott PKC izoformák eltérő módon képesek egyes adhézios molekulák expressziójának szabályozására. Azaz, habár a PKC β és ϵ overexpresszor sejtek egymáshoz nagyon hasonlóan hiperproliferatívnak, és a PKC α és δ izoformákat kifejező sejtek hipoproliferatívnak bizonyultak, bennük differenciált módon változott meg az egyes adhézios molekulák kifejeződése.



28. ábra Az adhíziós molekulák expressziója a különféle PKC izoformákat overexpresszáló HaCaT keratinocitákban

A) Az adhíziós molekulák kimutatására Western blotot készítettünk. B) Ezt követően megmértük az egyes immunjelek denzitometriás intenzitását, majd a kontroll („üres” vektorral transzfektált) sejtek vizsgálatakor kapott jel intenzitására, mint 100 %-ra normáltuk (3 független kísérlet átlag±SEM értékeit tüntettük fel, * = P<0,05)

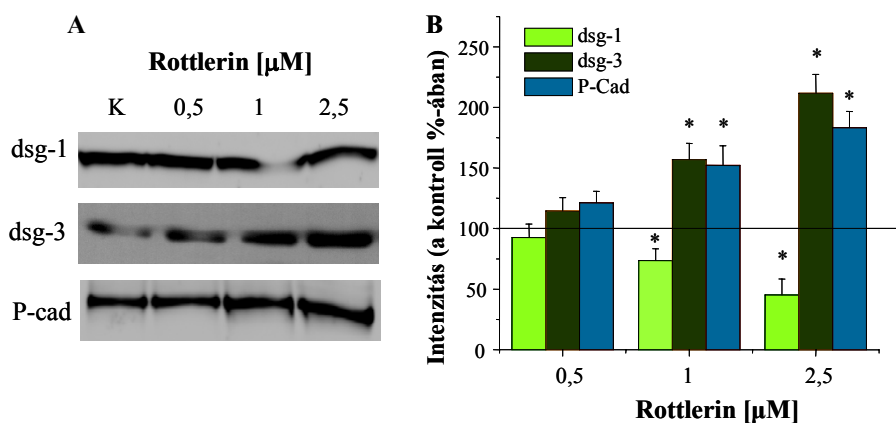
4. A PKCδ inhibitor Rottlerin hatása az adhíziós molekulák kifejeződésére kontroll HaCaT keratinocitákban

A PKC izoformák fenti szerepének további vizsgálatára farmakológiai és más molekuláris biológiai kísérletekkel folytattuk vizsgálatainkat. Mivel fenti kísérleteink során beigazolódott, hogy mind a proliferációs és differenciáltsági állapot, mind egyes PKC izoformák képesek az adhíziós molekulák expressziójának befolyásolására, ezért a PKC izoformák pontos szerepét olyan sejteken kívántuk tisztázni, melyekben az adott kísérletes körülmények között (és napok alatt) csak minimális mértékben változik az adhíziós molekulák kifejeződése. Kontroll HaCaT keratinocitákban az 1. és 3. tenyésztési napok között egyedül a dsg-3 szintje változott közepes mértékben, míg a másik két adhíziós molekula szintje az 1. napon mért szintekhez nagyon közel maradt. Így az alább bemutatandó kísérleteinket ezen fenti két tenyésztési nap között végeztük.

Először különféle PKC inhibitorok hatását kívántuk elemezni. Sajnálatos módon, a kereskedelmi forgalomban fellelhető izoforma-specifikus gátlószerekről kiderült, hogy különféle sejtes rendszerekben számos más enzim működését is képesek befolyásolni (415). Manapság egyedül a Rottlerinről állíthatjuk, hogy 5 µM koncentráció alatt képes a PKCδ gátlására (416). Kísérleteinkben ezért kizárólag ezen anyag hatását vizsgáltuk.

Western blot technikával kimutattuk, hogy kontroll HaCaT sejteket 2 napon keresztül naponta kezelve Rottlerin különféle koncentrációival (azaz a differenciálódásban pozitív szerepet játszó PKCδ gátlásával) a dsg-1 szintje dóziszfüggően csökkent, míg a dsg-3 és P-cad

kifejeződése fokozódott a kontrollhoz képest (29. ábra). Ezen adataink jó egyezést mutattak a PKC δ overexpresszor keratinociták vizsgálatok kapott eredményekkel, mely sejtekben megnövekedett dsg-1, valamint lecsökkent dsg-3 és P-cad kifejeződést mértünk.



29. ábra A PKC δ gátló szer Rottlerin hatása az adhézión molekulák expressziójára kontroll HaCaT keratinocitákban

A) A sejteket kb. 20 %-os konfluenciánál Rottlerin fenti koncentrációival 2 napig naponta kezeltük, majd az adhézión molekulák kimutatására Western blotot készítettünk. B) Ezt követően megmértük az egyes immunjelek denzitometriás intenzitását, majd a kontroll sejtek vizsgálatok kapott jel intenzitására, mint 100 %-ra normáltuk (3 független kísérlet átlag \pm SEM értékeit tüntettük fel, * = P<0,05)

5. RNS-interferencia segítségével csökkentett PKC expresszió hatása az adhézión molekulák kifejeződésére kontroll HaCaT keratinocitákban

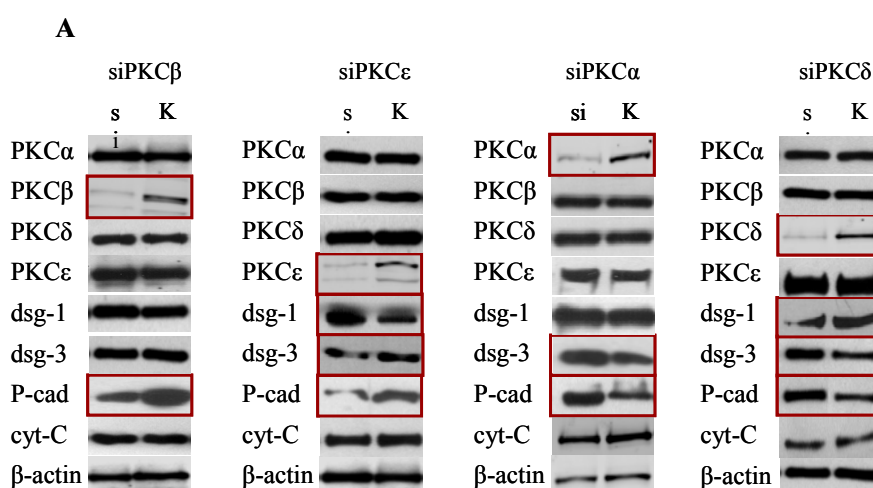
Végezetül kísérleteink utolsó részében, a fent bemutatott 1. és 3. tenyésztési napok között, RNSi technika alkalmazásával az egyes izoformák szelektív down-regulációját hajtottuk végre, majd vizsgáltuk az adhézión molekulák kifejeződésében bekövetkező esetleges módosulásokat. Először az RNSi beavatkozás hatékonyságát ellenőriztük Western blot alkalmazásával (30/A ábra). Megállapítottuk, hogy 12 óra elteltével egyik izoforma szintje sem csökkent a kontroll (azaz a kontroll RNSi próbával transzfektált) sejtekhez képest (30/B ábra). Ehhez nagyon hasonlóan kimutattuk továbbá, hogy a 24 óráig „kezelt” sejteken is csupán a PKC β szintje csökkent szignifikáns (de csak minimális) mértékben. Bebizonyosodott ugyanakkor, hogy 48 órával az RNSi transzfekció után az összes „célzott” PKC izoforma szintje jelentősen (átlagosan a kontroll kb. 20 %-ára) csökkent (30/B ábra). Fontos megállapításunk volt emellett, hogy a beavatkozás szelektívnek volt mondható, hiszen nem tapasztaltunk mérhető változást sem a többi („nem támadott”) PKC izoforma, sem a két vizsgált endogén kontroll kifejeződésében. Ennek megfelelően ezt követően a 48 óráig kezelt

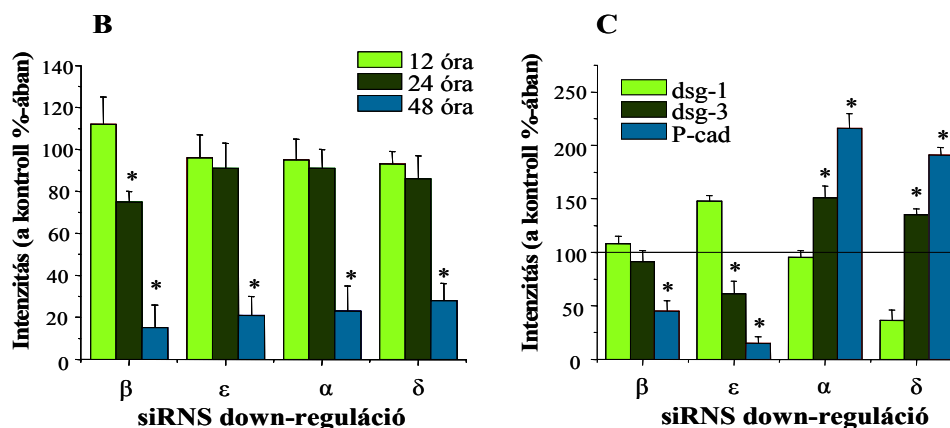
mintákban vizsgáltuk az adhéziós molekulák expresszióját. A western blot eredményeihez hasonló eredményeket kaptunk mRNA szinten is, melynek vizsgálatát Q-PCR segítségével végeztük.

Kimutattuk, hogy – hasonlóan a PKC overexpresszió esetében tapasztaltakhoz – a PKC izoformák szelektív down-regulációja differenciált módon változtatta meg az adhéziós molekulák kifejeződését (30/C. ábra). A „hiperpoliferatív” PKC β -t alacsonyan expresszáló sejtekben lecsökkent a proliferáló sejtek markereként értelmezhető P-cad szintje, míg a dsg-1 és dsg-3 kifejeződése nem módosult. Ehhez jól illeszkedően a szintén proliferációt fokozó PKC ϵ down-regulációja szignifikáns módon csökkentette a P-cad és (ugyancsak a stratum basaléban kifejeződő) dsg-3 szintjét, valamint növelte a differenciálódó sejtekben fokozottan megjelenő dsg-1 expresszióját.

A „hipoproliferatív” átalakulást eredményező izoformák vizsgálatakor ugyanakkor megállapítottuk, hogy a PKC α szintjének molekuláris csökkentése fokozta a dsg-3 és P-cad expresszióját, míg nem volt hatással a dsg-1 kifejeződésére. Ehhez nagyon hasonlóan a PKC δ down-regulációja ugyancsak növelte a dsg-3 és P-cad szintjét, ugyanakkor csökkentette a dsg-1 expresszióját.

Mindezen adataink tovább erősítették azon megállapításunk helyességét, hogy egyes sejtfelszíni adhézós molekulák kifejeződésének szabályozásában – a sejtek differenciáltsági állapotán túl – adott PKC izoformák meghatározó, egymástól részben eltérő, ugyanakkor egymással gyakran ellentétes szereppel bírnak.





30. ábra Az adhéziós molekulák kifejeződése RNSi technikával megváltoztatott PKC izoemzimintázatú kontroll HaCaT keratinocitákban

A) reprezentatív Western blot egy 48 óra után elvégzett kísérlet eredményét mutatja. B) Az RNSi beavatkozás hatása a „célzott” PKC izoformák expressziójára. C) Az RNSi beavatkozás hatása az adhéziós molekulák expressziójára. Mindkét esetben megmértük az egyes immunjelek denzitometriás intenzitását, majd a kontroll sejtek vizsgálatakor kapott jel intenzitására, mint 100 %-ra normáltuk (3 független kísérlet átlag±SEM értékeit tüntettük fel, * = P<0,05).

V.4.2. Megbeszélés

A dezmoszómális és a klasszikus cadherineik közötti kompenzáció vizsgálata

A különféle dsg molekulák között működő kompenzáció segítségével a dezmoszómális cadherineik bizonyos mértékig tudják kompenzálni egymás hiányát a nyálkahártyán és az epidermisben, vagyis a dsg-1 létre tudja hozni az adhéziót a dsg-3 nélkül is, és fordítva (237). Ezzel magyarázható, hogy pemphigus vulgarisban amennyiben kizárólag dsg-3 ellenes antitesttel rendelkezik a beteg, bőrtünet nem jelenik meg, csak nyálkahártya tünet, míg azon pemphigus vulgaris betegeknek, akik mind dsg-3, mind dsg-1 ellenes antitesttel rendelkeznek, bőrtünetük is van (250). Sokkal kevesebb az irodalmi adat arra nézve, hogy a dezmoszómális cadherineik és a klasszikus cadherineik között kimutatható-e hasonló együttműködés az epidermis struktúrális integritásának fenntartása érdekében. Az első in vivo bizonyítékot a klasszikus és dezmoszómális cadherineik közötti szinergizmusra Lenox és mtsai közölték (417). P-cad és dsg-3 kettős knock out egeret állítottak elő, mely egerben a két cadherin detektálhatósága teljesen hiányzott az epidermis bazális és szuprabazális rétegeiben valamint a szájnyálkahártya teljes vastagságában. Olyan knock out egereken, melyek csak a P-cad tekintetében voltak mutánsak alig voltak észlelhetők klinikai

jelek, a *dsg-3* mutáns egér a pemphigusra jellemző klinikai képet mutatta, de hosszan túlél, azonban a kettős knock out egér súlyos tünetei miatt egy hetes kora előtt elpusztult.

Saját vizsgálataink eredményei is alátámasztják a dezmoszómális cadherine és a P-cad között fennálló kooperációt, ugyanis immunhisztokémiai módszerrel pemphigusos tünetes bőr területén, ahol a *dsg-1* és *dsg-3* funkciója károsodott, a P-cad expresszió fokozódását, magasabb epidermális régiókban történő megjelenését mutattuk ki. Az irodalomban egyedül Hakuno és mtsai közöltek hasonló vizsgálatokat összesen 4 pemphigus vulgarisban és foliaceusban szenvedő beteg vonatkozásában (418). Véleményük szerint eredményeik arra utalnak, hogy a P-cad szerepet játszhat az autoimmun hólyagos betegségek patomechanizmusában, ugyanakkor mi inkább a klasszikus és dezmoszómális cadherine közötti szinergizmus újabb bizonyítékának tulajdonítjuk a kapott eredményeket. Ugyancsak felmerül a P-cad fokozott megjelenésének hátterében a megváltozott proliferáció és differenciálódás (419), vagy a megváltozott intracelluláris Ca^{2+} koncentráció (420). Régóta ismert, hogy a sejtfelszíni adhézis molekulák képződéséhez fiziológiás koncentrációjú Ca^{2+} szükséges (421). Az epitheliális sejtek gyorsan növekednek intercelluláris kapcsolódások nélkül $<0.1\text{mM}$ Ca^{2+} koncentráció mellett, azonban gyorsan összekapcsolódnak, ha a Ca^{2+} koncentráció 1.0mM -ra emelkedik. Ez azt jelentheti, hogy a dezmoszómális komponensek alacsony Ca^{2+} koncentráció esetén is szintetizálódnak, kapcsolódnak az intermedier filamentumokkal, és transzportálódnak a sejtfelszínre, de nem képesek adherens kötődésre, gyorsan internalizálódnak és degradálódnak (422-424). Az irodalomban azonban nagyon kevés információ található arról, hogy a PKC rendszer, mely működésében szintén fontos szerepe van a Ca^{2+} -nak, résztvesz-e az adhézis molekulák kifejeződésének szabályozásában.

A keratinociták differenciáltsági állapota, a PKC rendszer és az adhézis molekulák expressziója közötti kapcsolat vizsgálata

Első kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy humán immortalizált HaCaT keratinocitákban *in vitro* megfigyelhető-e a különféle adhézis molekulák epidermisben *in vivo* leírt jellegzete eloszlása (235,236). Kimutattuk, hogy a nagy sejtdenzitás által indukált differenciálódási program ugyanolyan változásokat indított be a sejtek tenyésztése során, mint az az epidermisben megfigyelhető. Azaz megállapítottuk, hogy a sejtek differenciálódásával párhuzamosan fokozódott a stratum granulosum marker *dsg-1* kifejeződése, míg főként a bazális keratinocitákban megjelenő *dsg-3* és P-cad expressziója csökkent. Kimondhatjuk tehát, hogy *in vitro* kísérletes elrendezésünk jól modellezte az *in vivo* állapotokat.

Vizsgáltuk emellett az adhéziós molekulák kifejeződését olyan HaCaT keratinocitákban is, melyek proliferációs és differenciáltsági állapota nem a sejtdenzitás változásának következményeként módosult, hanem különféle PKC izoformák rekombináns overexpressziójának köszönhetően. Megállapítottuk, hogy ezen hipoproliferatív (PKC α vagy δ overexpresszor) és hiperproliferatív (PKC β vagy ϵ overexpresszor) sejtekben a nagy sejtdenzitás-indukálta differenciálódási program beindulásával összevethető tendenciát mutatva változott meg az adhéziós molekulák kifejeződése. Kimutattuk ugyanakkor azt is, hogy az egyes PKC izoformák túltermeltetése, az adott hiper- vagy hipoproliferatív „csoporton” belül, egymástól részben vagy jelentősen eltérő módon változtatta meg az adhéziós molekulák szintjét, mely felvetette, hogy a folyamat szabályozásában a PKC izoformák is részvehetnek (adott esetben a differenciáltsági állapottól függetlenül).

Ezt vizsgálva – fenti kísérleteinket további molekuláris biológiai (siRNS technika) és farmakológiai megközelítésekkel kiegészítve – megállapítottuk, hogy a „hiperproliferatív” PKC β szerepe kizárólag a stratum basale marker P-cad kifejeződésnek fokozásában nyilvánul meg, míg ezen izoenzim aktivitása nincs hatással a szintén „proliferációs marker” dsg-3 és a stratum granulosumra jellemző dsg-1 expressziójára. Ugyanakkor az ugyancsak „hiperproliferatív” PKC ϵ nem fokozta a P-cad kifejeződését, de megnövelte a dsg-3 és csökkentette a dsg-1 expresszióját. Úgy tűnik tehát, hogy habár minkét izoforma jelenléte (egymástól megkülönböztethetelen módon) fokozza a sejtek proliferációját és csökkenti azok differenciálódását, az általunk vizsgált adhéziós molekulák kifejeződésének szabályozásában differenciált szereppel bírnak. Megjegyzendő, hogy egyedül a PKC ϵ esetében tapasztaltunk különbséget a rekombináns overexpresszió és az siRNS technika alkalmazása során. Azaz, a PKC ϵ overexpresszor sejtekben nem tapasztaltuk a P-cad fokozódását, ugyanakkor a PKC ϵ down-regulációja a mért legjelentősebb mértékben csökkentette ezen adhéziós molekula kifejeződését. A jelenség magyarázatát egyelőre nem ismerjük.

Kimutattuk továbbá, hogy a „hipoproliferatív” izoformák – a fenti izoenzimekhez hasonlóan (de a változás irányára vonatkozóan ellentétesen) – ugyancsak egymástól részben eltérő módon szabályozták az adhéziós molekulák kifejeződését. Bebizonyosodott, hogy a PKC α csökkenti a „proliferációs marker” dsg-3 és P-cad expresszióját, míg nincs hatással a „differenciálódási marker” dsg-1 kifejeződésére. Megállapítottuk azt is, hogy a PKC δ mindhárom molekula szintjét szabályozza: csökkenti dsg-3 és P-cad és fokozza a dsg-1 expresszióját. Kimondhatjuk tehát, hogy az általunk tanulmányozott PKC izoformák

meghatározó, egymástól részben eltérő, ugyanakkor egymással gyakran ellentétes szereppel bírnak a sejtfelszíni adhézios molekulák kifejeződésének szabályozásában.

Az eredmények egy más aspektusból (azaz az adott adhézios molekulák oldaláról) való összefoglalása ugyanakkor egy további érdekes jelenséget is megvilágít. Úgy tűnik ugyanis, hogy a különféle adhézios molekulák kifejeződésének mértéke függ természetesen, a keratinociták differenciáltsági állapotától, de ezen túlmenően eltérő számú PKC izoforma antagonisztikus összjátékaként „állítódik be”. Kísérleteinkben bemutattuk, hogy a P-cad expresszióját a három vizsgált izoforma szabályozza, a PKC β fokozza míg, a PKC α és δ csökkenti. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy az ugyancsak stratum basale „marker” dsg-3 szintjét a PKC α és δ gátló hatásán kívül csak a PKC ϵ növelte míg, az ugyancsak proliferációt serkentő PKC β nem befolyásolta. Végezetül bebizonyosodott, hogy az inkább differenciálódó sejtekben megjelenő dsg-1 expresszióját „csak” két izoforma módosította a PKC ϵ csökkentette a PKC δ növelte míg, a másik két izoenzim nem befolyásolta azt.

Saját eredményeinket irodalmi adatokkal nem tudtuk összevetni, mivel az egyes PKC izoenzimek adhézios molekulák kifejeződésére gyakorolt hatásának vizsgálata mind ez ideig nem volt ismert. Kitajima és mtsai eredményei, miszerint PKC inhibitorok és aktivátorok alkalmazása hatást gyakorolt a dezmoszomák és adherens junkciók kialakulására, felvetette már korábban, hogy a PKC rendszer valószínűleg jelentős szerephez jut az adhézios molekulák megjelenésének szabályozásában (258).

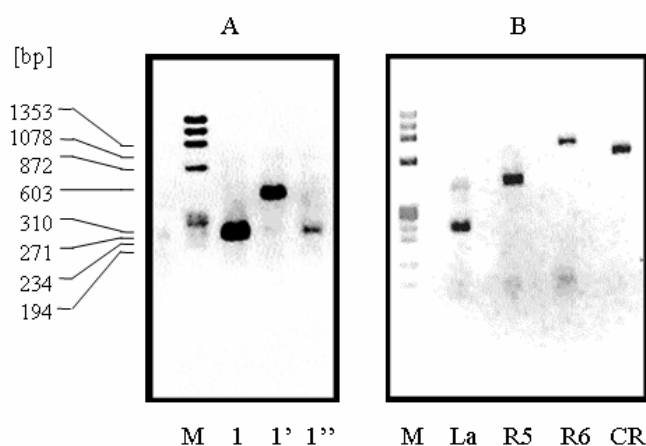
In vitro eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk tehát, hogy – habár természetesen további kísérletek szükségeltetnek annak tisztázására, hogy egyes izoenzimek, amelyek erőteljesen képesek a differenciáltsági állapot befolyásolására, miért csak az egyik vagy másik adhézios molekula kifejeződését szabályozzák – humán epidermalis HaCaT keratinocitákban a különféle sejtfelszíni adhézios molekulák kifejeződését a sejtek differenciáltsági állapota, valamint egyes PKC izoformák aktivitása egyaránt szabályozza. A szabályozás mechanizmusának teljes körű ismerete megadhatja a későbbiekben a lehetőséget ezen antigének képződésének befolyásolására autoimmun hólyagos bőrbetegségekben.

V.5. Szisztémás autoimmun kórképek

V.5.1. Eredmények

1. A három Ro/SSA mRNS és az La/SSB mRNS három hasítási formájának detektálása tenyésztett humán keratinocitákban és HaCaT sejtekben

Normál humán keratinocitákban és HaCaT sejtekben az La antigén mRNS 3 különböző formáját (31/A ábra) elsőként sikerült kimutatnunk, ahol az La 1' forma expressziója lényegesen kisebb, ha azt limfocitákhoz hasonlítjuk (nem mutatott). Kimutattuk a Ro antigén mRNS mindhárom formáját is ahol a bazális expresszió értéke az La 1 formához viszonyítva mindhárom Ro esetében kisebb volt (31/B ábra), és a 60 kD-os Ro mRNS szintje bizonyult a legkisebbnek.

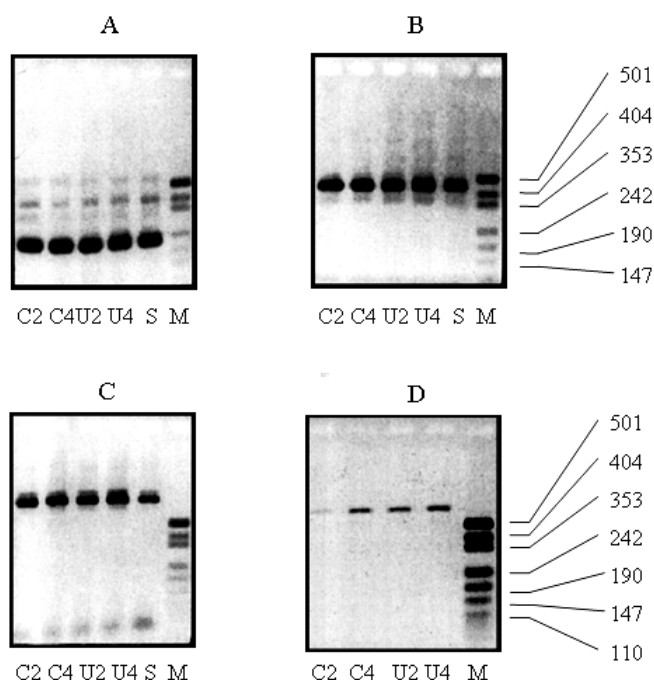


31. ábra: A Ro és La mRNS-ek PCR-rel történő kimutatása. A. Az La autoantigén mRNS-einek kimutatása PCR-rel HaCat sejtekben. A jelintenzitás kifejezi az RNS szintek arányát is. M = Φ X174 marker (Sigma); 1 = exon 1 forma; 1' = exon 1' forma; 1'' = exon 1'' forma. B. A Ro és La autoantigén mRNS-einek kimutatása PCR-rel HaCaT sejtekben. M = Φ X174 marker (Sigma); La = az La 1 és 1' mRNS-ei; R5 = Ro 52 kD-os forma; R6 = Ro 60 kD-os forma; CR = kalretikulin.

2. UVB besugárzás hatása a három Ro/SSA mRNS és az La/SSB mRNS három hasítási formájának expressziójára HaCaT sejtekben

A 200 J/m^2 UVB sugárzás hatását a besugárzást követő 1, 3, 6, és 12 óra elteltével vizsgáltuk először, de nem tapasztaltunk változást az mRNS szintekben. Ezt követően 24 és 48 óra elteltével néztük az UVB sugárzás hatását HaCaT sejtekben, ahol azt tapasztaltuk, hogy megnövekedett a kalretikulin mRNS szintje a besugározatlan kontrollokhoz képest (32/D. ábra). A 48 órás kontroll mintában is tapasztaltunk bizonyos fokú mRNS emelkedést,

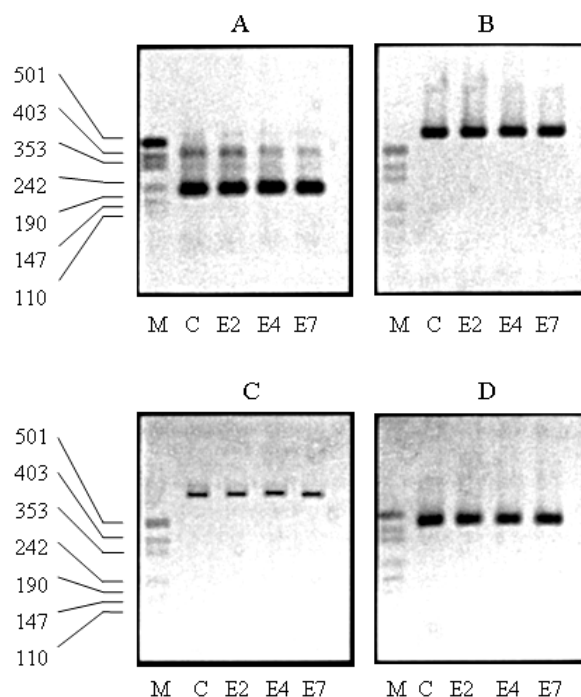
azonban a besugárzott mintákban ennél sokkal erősebb mértékű mRNS emelkedést detektáltunk. Nem láttunk számottevő változást a Ro 52 és 60 kD-os formáinak mRNS szintjében és az La formák mRNS szintjében sem (32/A, B és C. ábrák).



32. ábra: Az UVB sugárzás hatása a Ro és La mRNS-einek expressziójára HaCaT sejtekben. A. Az La 1 exon ill. 1' exon mRNS-ek szintjének változása. C2 = kontroll 24 órával (besugárzás nélkül); C4 = kontroll 48 órával; U2 = UV-besugárzott HaCaT sejtek 24 órával a besugárzást követően; U4 = UV besugárzott HaCaT sejtek 48 órával a besugárzás után; S = SCLE-s beteg bőréből izolált keratinociták, UV besugárzás nélkül. M = molekulásúly marker. B. A Ro 52 kD-os forma mRNS szintjének változása. C. A Ro 60 kD-os forma mRNS szintjének változása. D. A kalretikulin mRNS szintjének változása.

3. Ösztradiol kezelés hatása a három Ro/SSA mRNS és az La/SSB mRNS három hasítási formájának expressziójára HaCaT sejtekben

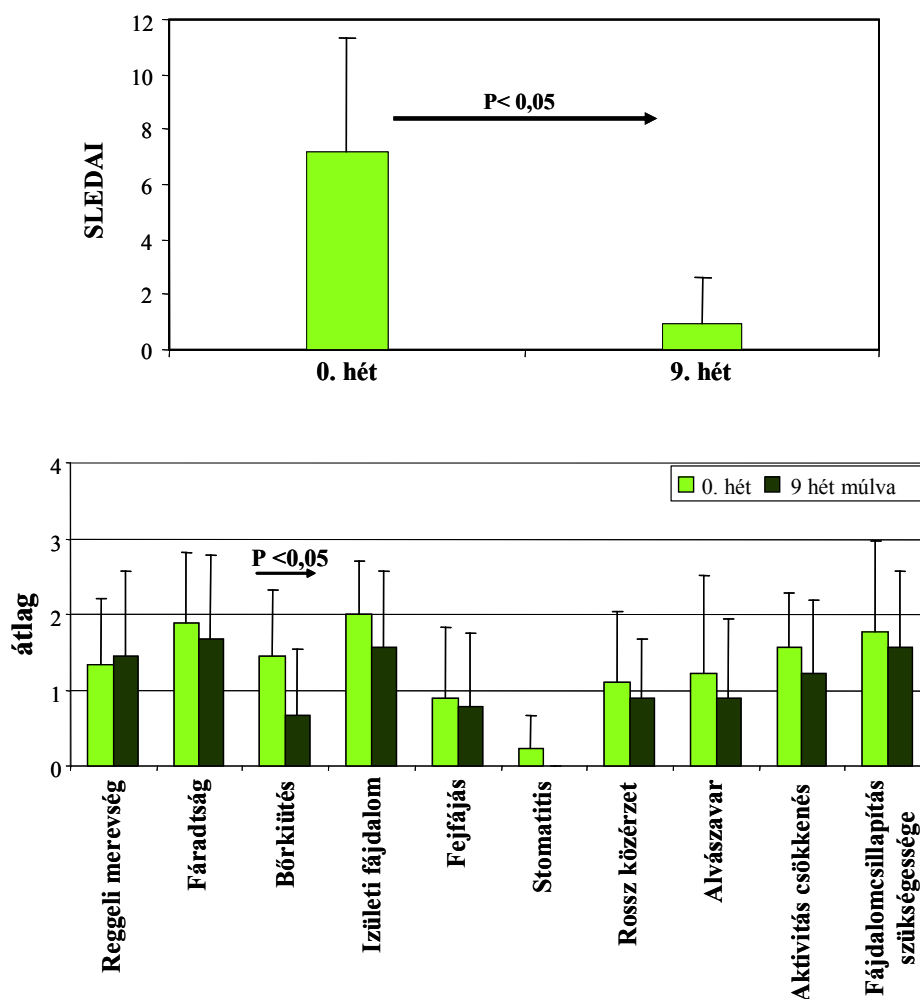
Az ösztradiol kezelés nem hozott lényeges változást az La 1 forma mRNS szintjében, még 72 óra elteltével sem (33/A). Ezzel szemben az La 1' forma mRNS szintje a kezelési idő előrehaladtával fokozatos csökkenést mutatott (33/A). Az ösztradiol kezelés nem hozott eltérést a kontrollhoz viszonyítva a Ro három mRNS formájánál sem (33/B, C, D).



33. ábra: Az ösztradiol kezelés hatása a Ro és La mRNS-einek expressziójára HaCaT sejtekben
A) Az La 1 exon ill. 1' exon mRNS-ek szintjének változása. C = kontroll (ösztadiol nélkül); E2 = 24 órá
ösztadiol kezelés; E4 = 48 órá
ösztadiol kezelés; E7 = 72 órá
ösztadiol kezelés; M = molekulásúly
marker. B) A Ro 46 kD-os forma mRNS szintjének változása. C) A Ro 60 kD-os forma mRNS szintjének
változása. D) A Ro 52 kD-os forma mRNS szintjének változása.

4. Szisztémás lupus erythematodeses betegek klinikai paramétereiben észlelt változások UVA1 terápia során (n=9)

Kilenc SLE-ben szenvedő beteg alacsony dózisú UVA1 terápiában részesült 9 héten keresztül és a betegek klinikai és laboratóriumi paramétereit vizsgáltuk a kezelés előtt és után. Az UVA1 terápia klinikai hatékonyságát két módszerrel mértük. A SLEDAI átlagos értéke szignifikánsan csökkent a terápia végére (átlagos kiindulási SLEDAI: $7,2 \pm 5,6$; átlagos terápia utáni SLEDAI: $0,9 \pm 1,8$; $P=0,005$, 34. ábra). A szubjektív klinikai betegség aktivitási index valamennyi paramétere egy kivételével (reggeli ízületi merevség) szintén javulást mutatott. Szignifikánsnak a bőrtünetek javulása mutatkozott (34/B ábra).



34. ábra: SLE-s betegek klinikai állapotának javulása UVA1 terápia hatására a SLEDAI (A) és a klinikai betegség aktivitási index paramétereinek (B) tükrében.

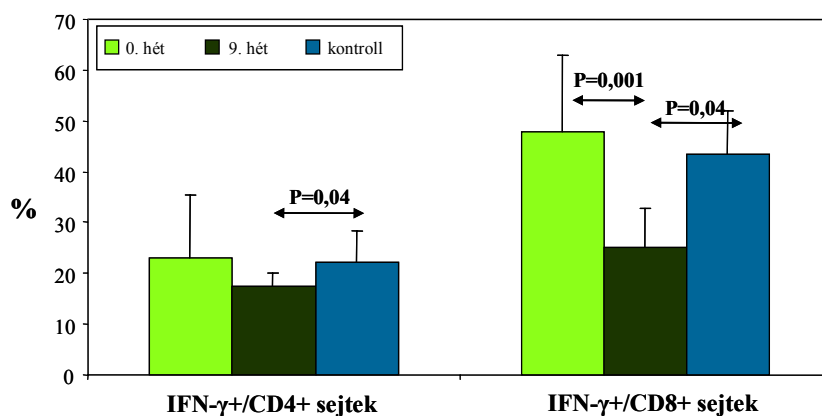
5. Szisztémás lupus erythematoses betegek laboratóriumi paramétereiben észlelt változások UVA1 terápia során

Számos immunológiai paraméter monitorizálását végeztük el a terápia előtt és a 9 hetes kezelés után. Ezek közül az autoantitestek vonatkozásában kiemelendő, hogy négy beteg volt ANA pozitív kiinduláskor, ők a kezelés után is ANA pozitívak maradtak (17. táblázat). Egyéb autoantitesteket nem tudtunk detektálni. A teljes komplement aktivitás, immunkomplex szint, C3, C4 és immunglobulin szintek, valamint a limfocita alosztályok arányai normál tartományba estek és nem változtak lényegesen a kezelés alatt sem, valamint anti-Ro/SS-A és anti-La/SS-B antitestek sem jelentek meg. Ezzel szemben az INF- γ termelő Th1 és Tc1 sejtek száma csökkent a terápia előtti értékhez viszonyítva, és szignifikánsan alacsonyabbá vált az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (35. ábra). Az adatokat a 17.

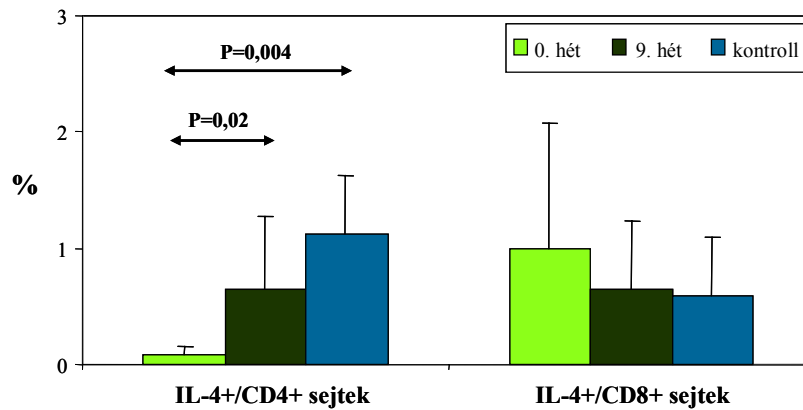
táblázat mutatja be. Az IL-4 termelő Th2 sejtek száma ugyanakkor szignifikánsan emelkedett, míg az IL-4+ Tc2 sejtek száma nem változott jelentősen az UVA1 kezelés hatására (36. ábra). Ezen változások eredményeként a Th1/Th2 és a Tc1/Tc2 arány jelentősen csökkent, az előbbi változás szignifikáns volt (37. ábra).

| | | 1. beteg | 2. beteg | 3. beteg | 4. beteg | 5. beteg | 6. beteg | 7. beteg | 8. beteg | 9. beteg | átlag \pm S.D. | P |
|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------------|-------|
| ANA | UVA-1 előtt | pozitív | negatív | negatív | pozitív | pozitív | pozitív | negatív | negatív | negatív | | |
| | UVA-1 után | pozitív | negatív | negatív | pozitív | pozitív | pozitív | negatív | negatív | negatív | | |
| SLEDAI | UVA-1 előtt | 12 | 14 | 6 | 4 | 4 | 17 | 4 | 2 | 2 | 7.2 \pm 5.6 | 0,005 |
| | UVA-1 után | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 0.9 \pm 1.8 | |
| Th1 arány (%) | UVA-1 előtt | 9.5 | 33.7 | 14.6 | 34.6 | 18.5 | 44.7 | 25.7 | 10.3 | 16.8 | 23.2 \pm 12.2 | 0,162 |
| | UVA-1 után | 12.6 | 20.6 | 18.3 | 14.3 | 14.8 | 19.7 | 19.4 | 18.1 | 17.9 | 17.3 \pm 2.8 | |
| Th2 arány (%) | UVA-1 előtt | 0.05 | 0.26 | 0.1 | 0.07 | 0.04 | 0.09 | 0.1 | 0.1 | 0.11 | 0.1 \pm 0.06 | 0,02 |
| | UVA-1 után | 0.9 | 0.36 | 2.06 | 0.32 | 0.09 | 1.1 | 0.2 | 0.48 | 0.3 | 0.64 \pm 0.6 | |
| Tc1 (%) | UVA-1 előtt | 39.6 | 57.3 | 40.5 | 70.1 | 41.5 | 64.7 | 53.3 | 20.6 | 43.9 | 47.9 \pm 15.8 | 0,001 |
| | UVA-1 után | 29.7 | 35.6 | 34.5 | 24.8 | 23 | 26.2 | 22.9 | 15.5 | 13.4 | 25.1 \pm 7.6 | |
| Tc2 (%) | UVA-1 előtt | 3.2 | 1.2 | 0.7 | 0.5 | 2.4 | 0.1 | 0.3 | 0.1 | 0.5 | 1.0 \pm 1.1 | 0,329 |
| | UVA-1 után | 1.8 | 0.7 | 0.7 | 0.3 | 0.6 | 0.8 | 0.1 | 1.3 | 0.2 | 0.7 \pm 0.5 | |
| Th1/Th2 | UVA-1 előtt | 190.4 | 129.6 | 146 | 494.3 | 462.5 | 496.7 | 257 | 103 | 152.7 | 270.2 \pm 166.6 | 0,002 |
| | UVA-1 után | 14 | 57.2 | 8.9 | 44.7 | 164.4 | 17.9 | 97 | 37.7 | 59.7 | 55.7 \pm 49 | |
| Tc1/Tc2 | UVA-1 előtt | 12.5 | 46.6 | 62.3 | 137.5 | 17.7 | 647 | 205 | 171.7 | 93.4 | 154.8 \pm 196 | 0,2 |
| | UVA-1 után | 16.8 | 48.8 | 47.3 | 72.9 | 37.7 | 32.8 | 190.8 | 12.2 | 60.9 | 57.8 \pm 53.5 | |

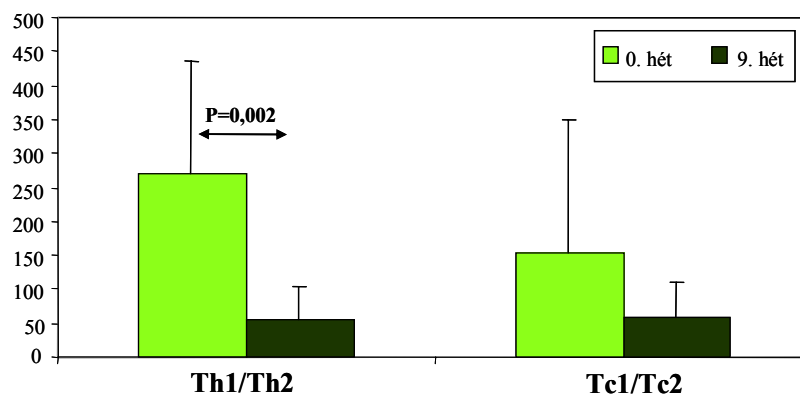
17. táblázat: Immunológiai laboratóriumi paraméterek értékei SLE-s betegeken UVA1 terápia előtt és után.



35. ábra: Az IFN-γ termelő Th1 és Tc1 sejtek arányának változása UVA1 terápia hatására SLE-s betegeken (n=9).



36. ábra: Az IL-4 termelő Th2 és Tc2 sejtek arányának változása UVA1 terápia hatására SLE-s betegeken (n=9).



37. ábra: A Th1/Th2 és Tc1/Tc2 sejtek arányának változása UVA1 terápia hatására SLE-s betegeken (n=9).

6. Intracitoplazmatikus citokinek meghatározása dermatomyositisben és polymyositisben

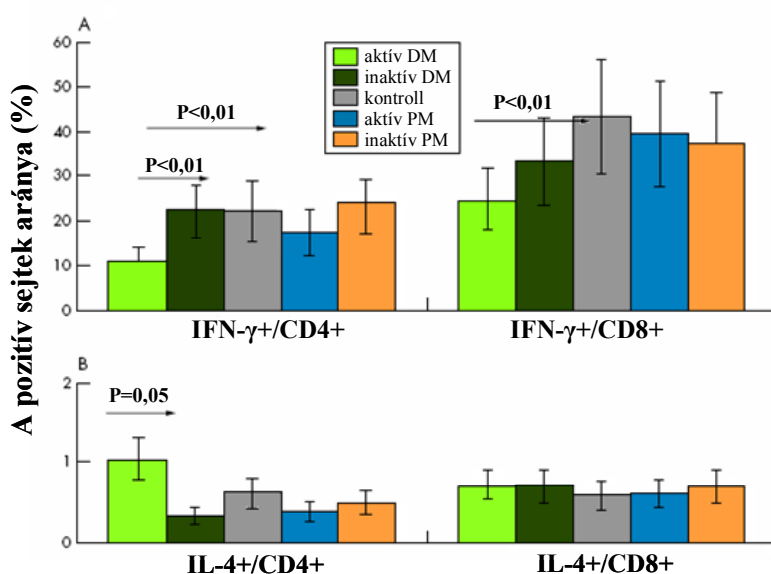
A vizsgált DM-s és PM-s betegeket aktív és inaktív csoportokra osztottuk. A betegség aktivitását a klinikai tünetek, az izombiopszia és a laboratóriumi tünetek (emelkedett CK, LDH) alapján ítéltük meg. Az aktív stádiumban lévő betegek frissen diagnosztizált személyek voltak, az inaktív stádiumban lévők pedig, vagy már nem kaptak gyógyszert, vagy azt a vizsgálatok megkezdése előtt legalább négy hétig nem szedték. A PM-ben szenvedők közül 13, a DM-ben szenvedő betegek közül 29 volt aktív stádiumban a vizsgálatok során. Aktív DM-ben (aDM) szenvedő betegek Th1 (IFN- γ + /CD4+) és Tc1 (IFN- γ + /CD8+) sejtjeinek aránya egyaránt szignifikánsan csökkent a kontroll egyének Th1 és Tc1 arányaihoz képest (18. táblázat, 38/A ábra). Inaktív DM-ben (iDM) ez a változás gyakorlatilag eltűnt, az IFN-

γ +/ $CD4$ + Th1 sejtek százalékos aránya a referens kontrollokéhoz hasonlóan alakult. A betegség aktív szakaszában csökkent Tc1 sejtarány is mérséklődött, de nem tűnt el teljesen a betegség inaktív stádiumában a kontrollokhoz képest. A Th2 ($IL-4$ +/ $CD4$ +) sejtek aránya jelentősen emelkedett volt aDM-ben és ez az arány lecsökkent iDM-ben a kontrollokhoz képest, bár nem volt szignifikáns az eltérés. A Tc2 ($IL-4$ +/ $CD8$ +) sejtek arányában nem volt jelentős változás (38/B ábra, 18. táblázat). Az $IL10$ +/ $CD4$ + és $IL-10$ +/ $CD8$ + T sejtek aránya emelkedett volt mind aDM-ben, mind iDM-ben, de a különbség a kontrollokhoz képest csak iDM-ben vált szignifikánssá (18. táblázat). Az $IL-4$ és $IFN-\gamma$ termelő $CD4$ + sejtek arányából számított Th2/Th1 sejtarány szignifikánsan magasabb volt aDM-ben és alacsonyabb iDM-ben a kontrollokhoz képest (39. ábra).

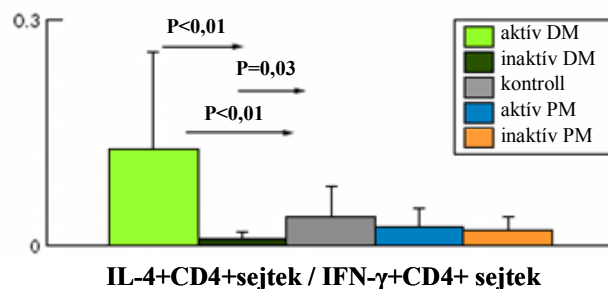
PM-ben sem a betegség aktív, sem inaktív szakaszában nem tudtunk szignifikáns eltéréseket detektálni a perifériás vér T sejtekben a kontrollokhoz hasonlítva.

| | aDM | iDM | Kontroll | Szignifikancia szint | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------------|------------------|
| | | | | Aktív vs kontroll | Inaktív vs kontroll | Aktív vs inaktív |
| $CD4$+/$IFN-\gamma$+ | 10,6 \pm 7,1 | 22,6 \pm 10,1 | 22,1 \pm 6,3 | <0,01 | n.sz. | <0,01 |
| $CD4$+/$IL-4$+ | 1,02 \pm 1,07 | 0,33 \pm 0,39 | 0,62 \pm 0,54 | n.sz. | n.sz. | <0,01 |
| $CD8$+/$IFN-\gamma$+ | 24,4 \pm 16,5 | 33,3 \pm 17,5 | 43,4 \pm 8,5 | <0,01 | n.sz. | n.sz. |
| $CD8$+/$IL-4$+ | 0,70 \pm 0,60 | 0,71 \pm 0,91 | 0,59 \pm 0,72 | n.sz. | n.sz. | n.sz. |
| $CD4$+/$IL-10$+ | 5,0 \pm 10,6 | 6,5 \pm 5,6 | 2,8 \pm 4,1 | n.sz. | <0,04 | n.sz. |
| $CD8$+/$IL-10$+ | 6,0 \pm 6,2 | 8,9 \pm 6,7 | 3,7 \pm 4,3 | n.sz. | <0,01 | n.sz. |

18. táblázat: aDM-ben (n=29) és iDM-ben (n=20) mért intracitoplazmatikus citokinek százalékos aránya.



38. ábra: $IFN-\gamma$ (A) és $IL-4$ (B) termelő Th és Tc sejtek aránya DM és PM aktív és inaktív fázisában, valamint kontrollokban (n= aDM:29, iDM:20, aPM:13, iPM:37).



39. ábra: Th2/Th1 arány DM és PM aktív és inaktív fázisában, valamint kontrollokban (n= aDM:29, iDM:20, aPM:13, iPM:37).

V.5.2. Megbeszélés

Az UVB sugárzás és az ösztrogén kezelés hatása a Ro és La mRNS-ek expressziójára

A Ro és a vele gyakran együtt előforduló La autoantigének ellen termelődő autoantitestek igen nagy gyakorisággal fordulnak elő NLE-ban, primer Sjögren szindrómában, SCLE-ben, ANA negatív SLE-ben és a homozigóta C2, C4 deficienciához társuló SLE-ben szenvedő betegek szérumában (262). Az utóbbi évek kutatásai alapján bizonyossá vált, hogy az La és Ro autoantigének ellen termelődő antitestek nem csupán diagnosztikai értékűek az említett autoimmun betegcsoportban, de patológiai szerepet is játszanak a tünetek kialakulásában (425,426). Ezt támasztja alá az a tény is, hogy NLE-ben az anyából a placentán átjutó keringő anti-Ro antitestek a magzat szervezetében veleszületett szív ingerületvezetési zavarhoz és SCLE-hez hasonló bőrtünetek kialakulásához vezetnek. Mind a bőrtünet, mind az ingervezetési zavar szoros összefüggést mutat a Ro elleni antitestek jelenlétével és néhány hónap után az anyai antitest szintjének csökkenésével párhuzamosan a bőrtünetek nyomtalanul eltűnnek (427). Emellett immundeficiens egerekbe iv. adott Ro ellenes antitestek kötődnek a beültetett humán bőr bazális keratinocitáihoz, SCLE-hez hasonló immunfluoreszens képet hoznak létre, és ez a kötődés UV fény hatására fokozódik (428). Az anti-La antitesteknek hasonló szerepe lehet, mivel ezek az antitestek gyakran detektálhatók anti-Ro pozitív szérumokban és ismertek magas anti-La antitest titerrel rendelkező SCLE-s betegek, akiknél alig lehet anti-Ro antitesteket detektálni (429,430).

Régóta ismert az a megfigyelés, miszerint SLE-s, SCLE-s és NLE-s betegek bőrtünetei exacerbációt mutatnak UV fény, elsősorban UVB hatására (431,432). Először

LeFeber és mtsai majd más munkacsoportok is kimutatták, hogy UVB besugárzást követően mind a Ro mind az La antigének, melyek nyugalomban a sejtmagban és a citoplazmában találhatók, megjelennek a keratinociták felszínén és így lehetőséget adnak arra, hogy a keringő antitestek a sejtfelszíni antigénjeikhez kapcsolódhassanak (272-274,276,433). Magasabb UV dózisok hatására a keratinocitákban apoptotikus elváltozások indulnak be, melyek során kisebb és nagyobb hólyagok jelennek meg a sejtfelszínen, melyek hordozzák az Ro és La antigéneket (426). Fiziológias UV dózisok mellett is létrejöhet azonban a Ro és La antigének sejtfelszínre kerülése, elsősorban ezen antigének átíródásáért felelős transzkripciós faktorok aktiválódása révén (262,427,434). A sejtfelszínre kerülő antigének és a keringő antitestek kapcsolódása után ADCC reakció vagy komplement mediált lízis kialakulása következtében a sejt pusztulása, szövethárosodás jöhet létre. Amennyiben a fenti folyamatok a keratinociták felszínén játszódnak le, lupus erythematosusra jellegzetes bőrtünetek alakulhatnak ki. Nem csupán a bőrtünetek kialakulása hátterében jut kulcsfontosságú szerep az említett autoantitesteknek, de NLE-ben a komplett szívblokk kialakulásában is szerepet játszanak (435). Az irodalomban nem volt tisztázott, hogy a keratinociták UV besugárzását követően mind a három Ro fehérjét kódoló gén, vagy csak bizonyos gének átíródása fokozódik-e.

Vizsgálataink során először mutattuk ki, hogy az egészséges egyénektől származó tenyésztett primer keratinocitákban és a HaCaT sejtekben jelen van az La mRNS 3 különböző formája és, hogy HaCaT sejtekben a három Ro mRNS bazális szintje is jól mérhető. A HaCaT sejtek spontán transzformált humán keratinociták és a bazális epidermis sejteinek jellemvonásait hordozzák (436). SLE-ben, SCLE-ben és NLE-ben megjelenő bőrtünetek elsősorban a bazális keratinociták immunológiai károsodása következtében jönnek létre. Kawashima és mtsai egy másik transzformált humán keratinocita sejtvonalban mutatták ki a három Ro polipeptid jelenlétét (437). Megfigyeléseik szerint ELISA technikát alkalmazva a 60 kD-os polipeptid alap szintje volt a legalacsonyabb, a kalretikuliné a legmagasabb. Saját eredményeink alapján HaCaT sejtekben szintén a 60 kD-os forma mRNS szintje volt a legalacsonyabb. Az La mRNS három variánsa tekintetében alacsonyabb La exon 1' szintet találtunk, mint korábbi közlések tapasztaltak Sjögren szindrómás beteg limfocitáiban (271).

Az alkalmazott UV sugárzás hatására HaCaT sejtekben az 52 és 60 kD-os Ro, valamint az La exon 1 formáinak mRNS szintje nem változott. A kalretikulin mRNS szintje azonban 24 és 48 órás besugárzás után magasabb volt, mint a kontrollokban, ami jó egyezést mutat Kawashima és mtsai eredményeivel (437). Ők a kalretikulin fehérje expressziójának növekedését észlelték egy másik transzformált humán epidermális keratinocita vonalon

(A431), már 24 órával a besugárzást követően. Nemcsak a fehérjeszint változását figyelték meg, de növekedett a sejtfelszíni antigén reprezentáció is, amit a megnövekedett specifikus antiszérum-kötődés jelzett. Nem mutattak ki változást, azonban az 52 és 60 kD-os Ro fehérjék expressziójában és sejtfelszíni megjelenésében. Saját eredményeink és Kawashima és mtsai adatai alapján feltételezhetően a Ro komplex kiemelkedően fontos szereplője a 46 kD-os kalretikulin, mely UV besugárzást követően fokozott génátíródást és mRNS, illetve fehérje szintézist követően megjelenik a keratinociták felszínén.

A nemi hormonok szerepét az SLE patogenezisében számos adat bizonyítja (438). A betegek 90%-a nő, a tünetek leggyakrabban a serdülőkor után jelentkeznek és a fogamzóképes korban a legsúlyosabbak. A betegség fellángolása terhesség, menstruáció idején, illetve fogamzásgátlók szedése esetén észlelhető a leggyakrabban (439,440). Autoimmun lupusos nőstény egerekben a betegség sokkal korábban jelentkezik és súlyosabb tünetekkel jár, mint a hím egyedekben, továbbá androgén kezelés jelentős javulást idéz elő (441). Az SLE mellett a női dominancia és az ösztrogén szerepe megfigyelhető SCLE-ben, NLE-ben és Sjögren-szindrómában is (442,443).

Az ösztrogén és a Ro, ill. La ellen termelődő autoantitestek kapcsolatát illetően Furukawa és mtsai korábban kimutatták, hogy tenyésztett humán keratinocitákban ösztradiol hatására fokozódik a Ro és La antitest kötődése (430). Ez a fokozott kötődés csak a kis kuboidális, gyorsan osztódó, nem differenciálódott sejtekben volt kimutatható, a polygonális vagy differenciált, nagyobb keratinocitákban nem. Mivel a HaCaT sejtek az erősen proliferálódó bazális keratinociták in vitro modell sejtjeinek tekinthetők, így ezt a rendszert választottuk kísérleteinkhez (436). Vizsgálatainkban az ösztradiol kezelés hatására nem volt megfigyelhető változás a Ro mRNS-ek szintjében, az La 1' forma mRNS szintje viszont az idő előrehaladtával jelentős csökkentést mutatott. Eredményeink nem feltétlenül jelentenek ellentmondást Furukawa és mtsai eredményeivel, miszerint a Ro és az La antigén sejtfelszíni megjelenése fokozódik ösztrogén kezelés hatására (430). In vivo és in vitro megfigyelések alapján az ösztrogén hatása során a sejtmagban lévő receptorához kapcsolódik, ezt követően a hormon-receptor komplex aktiválódik, ami génexpressziós változást eredményez (430). Elképzelhető, hogy a citoplazmatikus és a magban lévő La és Ro autoantigén nagy mennyiségben történő felszínre kerülése, amit Furukawa detektált, nem jár azonnal együtt a megnövekedett mRNS termeléssel. Az La 1' forma mRNS szintje viszont fokozatosan csökkent a vizsgált kezelési idő alatt, melynek pontos magyarázata további vizsgálatokat igényel.

Eredményeinket összevetettük Wang és Chan eredményeivel is, akik az ösztadiol kezelésnek a Ro mRNS szintekre kifejtett hatását primér keratinocita kultúrákon és emlőtumor sejteken vizsgálták (444). Noha ők bizonyos növekedést láttak az 52 kD-os Ro mRNS szintjében, eredményeik nem voltak meggyőzőek, hiszen a változást nem minden esetben tudták reprodukálni, és csak egyes sejt kultúrákban tapasztaltak növekedést. Az általunk kapott eredmények, ill. Wang és Chan által észlelték közötti különbségeket még az eltérő sejttípus alkalmazása is magyarázhatja.

UVA1 terápia klinikai és immunológiai hatásainak vizsgálata szisztémás lupus erythematoses+ betegeken

Állatkísérletes majd humán vizsgálatokban először McGrath és munkacsoportja bizonyította az UVA1 terápia hatékonyságát SLE-ben. Az első vizsgálatban 15 SLE-s beteg vett részt, akiknél a 3 hétig tartó UVA1 fototerápia a betegek klinikai tüneteinek szignifikáns csökkenését eredményezte, a DNS elleni autoantitestek, a CD4+ T sejt arány és a B sejt arány csökkenésének kíséretében (284). Az anti-Ro autoantitest pozitív betegek csoportja - mely a leginkább fényérzékeny- eredményeik szerint szignifikánsan jobban reagált a kezelésre, mint az ilyen autoantistettel nem rendelkező csoport. A következő UVA1 terápia alkalmával, melyet 10 beteg részvételével folytattak, a korábbi eredmények mellett az anti-Ro illetve az ANF titerének csökkenését illetve megszűnését tapasztalták 6 páciensnél. 4 beteg kezelését, a 3. terápiás hetet követően tovább folytatták összesen 8 hónapon keresztül a heti kezelések számát 2-re mérsékelve. A hosszútávú kezelés biztosította az elért eredmények fenntartását, és a klinikai tünetek kisebb mértékben ugyan, de tovább enyhültek (278). A kutatócsoport harmadik tanulmányában nagyobb beteganyagon (26 nőbeteg) 6, illetve 12 hétig végzett fénykezelést (285). A kezelés első 6 hetében két csoportra osztva - a 3. hét után cserével - kettős vak próbán vettek részt a betegek, ahol a placebo a látható fénnel végzett azonos időtartamú fénykezelés volt. A placeboval kezelt csoport betegség aktivitása gyakorlatilag nem csökkent a fototerápia során, illetve abban a csoportban, amelyik a második 3 hetes ciklusban lett placeboval besugározva újra fokozódott, bár a kiindulási szintet nem érte el.

Saját vizsgálataink során 9 SLE-s betegnél észleltük az alacsony dózisu UVA1 terápia klinikai hatékonyságát, melynek során a SLEDAI betegség aktivitási score szignifikánsan csökkent és a szubjektív klinikai betegség aktivitási index minden paramétere, egy kivételével szintén javulást mutatott. Hat betegnél az UVB spektrumban észlelt fényérzékenység megszűnt, aminek oka lehet az UVA1 okozta szarurétegvastagodás és fokozott pigmentáció. Polderman és mtsai által végzett két tanulmányban kettős vak, kontrollált módon vizsgálták

az UVA1 terápiás hatékonyságát és szignifikánsan hatékonyabbnak találták SLE-ben a látható fény hatásánál (286,287). Mind McGrath, mind Polderman kiemelik és mi is alátámasztjuk azt a megfigyelést, miszerint sem klinikai aktivitásban, sem laboratóriumi paraméterekben megnyilvánuló mellékhatások nem jelentkeztek az UVA1 kezelés alatt.

Korábbi immunológiai tanulmányok leírása szerint a Th1 és Tc1 sejtek elsősorban a sejt mediált autoimmun kórképekben, míg a Th2 és Tc2 sejtek elsősorban az antitest mediált autoimmun kórképekben, mint az SLE, játszanak döntő szerepet (445-447). Az utóbbi évek kutatásai azonban rávilágítottak arra, hogy ilyen éles elkülönítést nem lehet tenni, és különösen az SLE esetében sokkal komplexebb a patogenezis, mint korábban feltételezték (448). SLE-s állatmodellekben bebizonyosodott, hogy a Th1 sejtek is szerepet játszanak és az IFN- γ az egyik legfőbb effektor molekula (448). SLE-s betegek vérében emelkedett IL-12 és IFN- γ szint valamint emelkedett Th1/Th2 arány mutatható ki (447,449).

Az általunk végzett immunológiai vizsgálatok 9 hétig tartó UVA1 kezelés után az IFN- γ termelő Th1 és Tc1 sejtek arányának csökkenését mutatták a kiindulási értékekkel összevetve, mely csökkenés szignifikáns volt a normál kontrollhoz viszonyítva. Ezzel párhuzamosan az IL-4 termelő Th2 sejtek száma szignifikánsan növekedett, a Tc2 sejtek aránya nem mutatott jelentős eltérést. A fenti változások eredményeként a Th1/Th2 és Tc1/Tc2 arányok jelentősen csökkentek. Mivel az IFN- γ fontos szereppel bír az SLE patogenezisében, az UVA1 kedvező klinikai hatásának hátterében az egyik lehetséges mechanizmus a Th1 és Tc1 sejtek általunk először megfigyelt csökkent aktivitása lehet.

Az UVB és az UVA1 spektrumok biológiai hatásai bizonyos szempontból ellentétesek. Míg az UVB kontraindikált SLE-ben, mivel a tünetek aktivitását eredményezi, addig az UVA1 kedvező hatással bír. Az UVA1 mélyebben penetrál a bőrbe, eléri a dermist és annak ereit, illetve a keringő sejteket, fokozza a fotoreaktivációt (450). Azonnali apoptózist indukál T és B limfocitákban, gátolja a TNF- α felszabadulását, mely a napfény indukálta erythema mediátora, ugyanakkor a sejt közvetített immunválaszra kifejtett hatásairól szóló közlemények ellentmondásosak (451-455). Ugyancsak kimutatták, hogy UVA1 hatására fokozódik az IL-10 felszabadulás, mely csökkent IL-12 termelést eredményezhet. Az alacsonyabb IL-12 szint az IFN- γ termelő Th1 és Tc1 sejtek képződésének csökkenéséhez vezethet (453).

Véleményünk szerint az SLE-s betegek egy adott csoportjában az alacsony dóziséú UVA1 terápia egy biztonságos és hatékony adjuváns kezelési mód, mely kiegészíti a tradicionális farmakológiai kezelést. A klinikai hatékonyság hátterében feltehetően a csökkent Th1/Th2 valamint Tc1/Tc2 arány, és csökkent IFN- γ termelő sejt szám áll. Elismerés

számunkra, hogy neves folyóirat 2006-os számában megjelent szerkesztői tanulmányban alappreferenciaként hivatkozza a szerző munkánkat (456).

Citokin termelés vizsgálata polymyositisben és dermatomyositisben

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre az idiopathiás gyulladásos myopathiák citokin eltéréseiről, és az eddigi eredmények elsősorban szövettani vizsgálatokból származnak. Munkánk során az irodalomban még nem olvasható megközelítéssel próbáltunk újabb adatokat szolgáltatni a betegségek patogenezisééről. Arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a DM és a PM eltérő patogenezise megnyilvánul-e a perifériás vér mononukleáris sejtek eltérő citokin termelésében és ezzel jellemezhető-e a betegségek aktív illetve inaktív szakasza.

Az intracitoplazmatikus citokin meghatározások eredményeiben jelentős különbséget tapasztaltunk a két betegség között. Az aDM-ben szenvedő betegek esetében szignifikánsan csökkent mind a CD4+, mind a CD8+ Th1 és Tc1 sejtek IFN- γ expressziója, mely változás eltűnt illetve mérséklődött a betegség inaktív szakában. Emellett aDM-ben a Th2 sejtek aránya emelkedett, a változás iDM-ben eltűnt, illetve nem érintette a CD8+ Tc2 sejteket. Ebből adódóan aDM-ben a Th2/Th1 arány jelentősen emelkedett, iDM-ben pedig csökkent. Ezek a változások PM-ben nem voltak kimutathatók.

Az IL-10 termelés vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy iDM-ben szignifikánsan emelkedett az IL-10 expresszió. Az IL-4 és IL-10 expresszió egymással nem megegyező változásai is arra utalnak, hogy az IL-10 nem Th2 citokin, hanem egy immunregulációs folyamatokban igen fontos szerepet betöltő molekula. Az irodalomban elvértve találunk irodalmi adatokat a perifériás vér citokin profilját illetően PM és DM betegségekben. Ezek közül mindenképpen kiemelendő Hagiwara és mtsai közleménye, akik a perifériás vér mononukleáris sejtjeit vizsgálták ELISPOT technikával (298). DM-ben aktivitásfüggő módon igazolták a CD4+ T sejtek IFN- γ termelésében bekövetkezett csökkenést, míg az IL-4 vonatkozásában nem mutattak ki szignifikáns eltérést, az IL-6 (egy másik Th2 citokin) termelő sejtek számát pedig, magasnak találták. Munkájuk konklúziójaként azt vonták le, hogy a DM különbözik a többi myopathiás megbetegedéstől, amit a csökkent Th1 és fokozott IL-6 expresszióval magyaráztak. Eredményeink tehát részben hasonlóak Hagiwara és mtsai eredményeihez, mivel egy másik módszerrel jelentős különbséget tudtunk kimutatni DM-ben és PM-ben a perifériás vér mononukleáris sejtek citokin mintázatában. Véleményünk szerint a megállapított fokozott Th2/Th1 arány DM aktív szakaszában arra utal, hogy a humorális immunválasznak jelentős szerepe van a betegség patogenezisében és ezeket a változásokat a PM citokin profilja nem tükrözi.

Eredményeink alátámasztják azokat a megfigyeléseket, miszerint a DM és a PM - az intracitoplazmatikus citokin meghatározások alapján is - két különböző patomechanizmusú betegség lehet. Míg PM-ben inkább CD8⁺ T sejt mediálta folyamat vezet az izom károsodásához, addig DM-ben a B sejteknek lehet patogenetikai szerepük, és a kóros humorális immunológiai folyamatok elindításában/fenntartásában lehet jelentősége az észlelt Th2/Tc2 irányú polarizációnak.

VI. Eredeti tudományos felismerések

1. Elsőként mutattuk ki atopiás dermatitisben (AD) az IL-10 termelő regulatív jellegű T limfociták arányának szignifikáns emelkedését a perifériás vérben és megerősítettük, hogy az AD-ben kimutatható Th2 és Tc2 dominancia a szignifikánsan magasabb IL-13 termelés és nem az IL-4 termelés következtében jön létre.
2. Elsőként állapítottuk meg, hogy AD-ben a perifériás vér mononukleáris sejteken a TLR2, TLR4, CD14 és CD180 funkciója nem károsodik, de expressziójuk szignifikánsan fokozódik. A sejtfelszíni TLR szám növekedés elsősorban az AD intrinzik formájára jellemző.
3. Elsőként vizsgáltuk psoriasisos arthropathiában (PA) az alphacalcidol terápia immunmoduláns hatásait. A szisztémás alphacalcidol kezelés a Tc1 típusú immunválasz aktivitásának átmeneti, a betegség aktivitásának folyamatos csökkenését eredményezte.
4. Krónikus idiopatiás urticariában (KIU) elsőként közöltük, hogy a perifériás vérben sem T1 sem T2 dominancia nem mutatható ki, az IL-10 termelő regulatív T sejtek aránya viszont szignifikánsan emelkedik.
5. A CD63 bazofil aktivációs teszt (BAT) módosításával egy új, az autoimmun urticaria (AIU) diagnosztikájában megbízhatóan alkalmazható, specifikus tesztet dolgoztunk ki, mely jó korrelációt mutat a hisztamin felszabadulási (HR) teszttel.
6. A BAT alapján diagnosztizált AIU csoportot elsőként hasonlítottuk össze a KIU és fizikális urticaria (FU) csoportokkal. Az AIU csoport score értékei és terápiára adott válaszai alapján az autoimmun csoportra szignifikánsan súlyosabb tünetek jellemzők.
7. Megállapítottuk, hogy HaCaT keratinocitákon UVB besugárzás hatására a három Ro/SS-A fehérje közül a 46 kD-os kalreticulin mRNS szintje emelkedik meg és, hogy a különféle adhézis molekulák (dsg-1, dsg-3, P-cad) kifejeződésének mértéke függ a keratinociták differenciáltsági állapotától, valamint ezen túlmenően a különböző PKC izoformák szabályozása alatt is áll. Pemphigus vulgaris és foliaceus esetén a P-cad adhézis molekula expressziójának fokozódását, magasabb epidermális régiókban történő megjelenését mutattuk ki.
8. Az alacsony dózisú UVA1 terápiát hatékonynak és biztonságosnak találtuk szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegeken. A megfigyelt klinikai javulás hátterében elsőként közöltük a Th1/Th2 és Tc1/Tc2 arány, valamint az INF- γ termelő sejtek számának csökkenését.

9. Dermatomyositis (DM) és polymyositis (PM) esetén jelentős különbséget mutattunk ki a perifériás vér limfociták citokin termelésében. DM aktív fázisában a Th1/Th2 arány jelentős csökkenését, remisszióban emelkedését figyeltük meg.

VII. Az eredmények hasznosíthatósága

Eredményeink közül a klinikai gyakorlat számára közvetlenül is hasznosíthatónak az alábbiakat véljük:

1. AD-ben az IL-10 és IL-13 szintek laboratóriumi monitorizálása értékes adatokat szolgáltathat. Az IL-13 szint emelkedése, mint fontos Th2 citokin, patogenetikai szerepet játszik a betegség kialakulásában, míg az IL-10 következményes megemelkedése regulatív jelleggel jön létre. Ezek esetleges befolyásolása terápiás értékű lehet.
2. PA-ban az alphacalcidolt mint gyulladáscsökkentő, immunreguláló szert lehet alkalmazni, adjuváns terápiaként.
3. Az általunk kidolgozott módosított BAT segítséget nyújt az AIU diagnosztikájában. A krónikus urticaria csoporton belül az AIU-s betegek kiválasztása fontos, mivel a betegeknél megfigyelhető súlyosabb klinikai tünetek, és a konvencionális terápia gyakori sikertelensége indokolhatja az immunmoduláns (cyclosporin A, plazmaferézis) kezelés bevezetését.
4. Reményeink szerint gyakorlati jelentősége lehet a jövőben annak, ha az autoantigén természetű adhéziós molekulák szintézisének szabályozó mechanizmusait minél pontosabban megismerjük.
5. Az alacsony dózisu UVA1 terápia SLE-s betegek meghatározott csoportjánál kiegészítő jellegű adjuváns kezelésként alkalmazható, mivel kedvező klinikai és immunológiai laboratóriumi változásokat idéz elő a betegekben.
6. A DM és PM patogenezisében megfigyelt jelentős különbségek az alkalmazott terápiaik differenciálásának szükségességére hívja fel a figyelmet.

Jövőbeni terveink

Az értekezésben részletesen ismertetett vizsgálataink folytatásaként jelenleg a regulatív T sejtek újabb csoportját a CD4+/CD25+/Foxp3+ Treg sejteket tanulmányozzuk AD-ben, részben a lézionális bőrben immunhisztokémiai módszerrel, részben a perifériás vérben áramlási citometria segítségével. A biopsziás anyagokat az AD modelljének tekinthető pozitív atopy patch teszt mintákból nyerjük, mely bőrtesztet az elmúlt évben állítottuk be klinikánkon az AD teljes körű diagnosztikájának részeként. Ugyancsak folyamatban vannak az APS-ek, elsősorban a Langerhans sejtek és a dermális dendritikus sejtek vizsgálatai AD-ben, amikor is a perifériás vér monocitákból tenyésztés útján előállított APS-ek fenotípusos és

funkcionális jellemzőit hasonlítjuk össze atopiás és kontroll egyénekben. Hamarosan lezárulnak a TLR gének polimorfizmusait tanulmányozó kísérleteink is AIU-ban és AD-ben.

További terveink között szerepel a BAT alkalmazása I-es típusú hiperszenzitivitási reakciókban, elsősorban gyógyszerallergiák kivizsgálása során. Szintén tervezzük tovább folytatni kutatásainkat a regulatív T sejtek területén. Legújabb közlemények már a Th1 és Th2 sejteknek két funkcionális variánsát írják le, a $\text{TNF-}\alpha^{2+}/\text{IL-10}^-$ gyulladásos típusú és a $\text{TNF-}\alpha^{+/-}/\text{IL-10}^+$ regulátoros típusú sejteket, ezek megoszlását szeretnénk tanulmányozni AD-ben. Az elkövetkező időkben reméljük, hogy a D3 vitamint, mint fiziológiás immunreguláló anyagot be tudnánk építeni szélesebb körben az immunpatológiai kórképek terápiájába. A D3 vitamin és az UVA1 terápia kombinált alkalmazása izgalmas terápiás és kutatási lehetőségekkel kecsegtet.

VIII. Köszönetnyilvánítások

Megköszönöm **családom**, férjem, édesapám és édesanyám támogató türelmét, amivel fogadták és fogadják azt, hogy a klinikai munkám mellett tudományos tevékenységre olyan sok időt fordítok.

Köszönet tanáraimnak és kollaborációs munkatársaimnak, akiktől sokat tanultam és akikkel együtt dolgozhattam és dolgozhatok:

Köszönöm **Dr. Hunyadi János** professzor úrnak, hogy klinikai és tudományos munkám során végig támogatott, tanácsaival segített.

Köszönöm **Dr. Horkay Irén** professzornőnek, hogy a bőrgyógyászat szépségeibe egyetemi éveim alatt bevezetett.

Köszönöm **Dr. Nagy Endre** professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra, hogy a Bőr- és Nemikórtani Klinikán elkezdhettem dolgozni.

Köszönöm **Dr. Mészáros Csilla** tanárnőnek, hogy a bőrgyógyászati allergológiai betegek gondozásának kezdeti nehézségein átsegített.

Köszönöm **Dr. Ádány Róza** professzornőnek, hogy elindított a tudományos kutató életben tudományos diákköri éveim alatt.

Köszönöm **Dr. Sipka Sándor** professzor úrnak, hogy a Regionális Immunológiai Laboratóriummal együttműködésben végzett valamennyi munkám során segítségemre volt.

Köszönöm **Dr. Antal-Szalmás Péternek**, hogy az atópiás dermatitis, és a psoriasis témakörökben végzett citokin meghatározásokban és TLR vizsgálatokban együtt dolgozhattunk.

Köszönöm **Dr. Bíró Tamásnak**, hogy az adhézións molekulák és a PKC rendszer kapcsolatának tanulmányozása során a vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében is nagy segítségemre volt. Külön köszönöm, hogy két kiváló Ph.D. hallgató-t irányított hozzám.

Köszönöm **Dr. Gyimesi Editnek**, hogy az autoimmun urticaria diagnosztikájában beállított bazofil aktivációs teszt kidolgozásában szorosan együttműködött velem.

Köszönöm **Dr. Kiss Emesének** és **Dr. Simics Enikőnek**, hogy az SLE-s betegeken végzett UVA1 terápiás vizsgálatokban nagy segítségemre voltak.

Köszönöm **Dr. Kovács Anikónak** értékes munkáját a P-cad immunhisztokémiai kimutatásában.

Köszönöm **Dr. Gaál Jánosnak**, férjemnek, a családi támogatáson túlmenően is értékes együttműködését a psoriasisos arthropathiás betegek alphacalcidol kezelésének vizsgálata során.

Köszönöm **Dr. Dankó Katalin** tanárnőnek a polymyositises és dermatomyositises betegek vizsgálata során nyújtott segítségét.

Köszönetet mondok Ph.D. hallgatóimnak:

Dr. Aleksza Magdolnának kiváló laboratóriumi tudásáért és gyors, pontos munkájáért.

Dr. Irinyi Beatrixnek baráti segítségéért, támogatásáért, lelkes munkájáért.

Dr. Nagy Georginának, aki áldozatos és lelkiismeretes munkájával nagyban hozzájárult az értekezés elkészítéséhez.

Dr. Gál Mónikának kiváló szaktudásáért és támogató segítségéért.

Dr. Páyer Editnek a molekuláris biológiai vizsgálatok nagy részének elvégzéséért.

Köszönetet mondok tudományos diákköri hallgatóimnak, akiktől sokat kaptam, akik biztattak lelkesedésükkel, és akik tanítása több örömet okozott, mint amennyi fáradtságot jelentett, közülük is kiemelném **Gaál Krisztina** és **Orosz Zsuzsanna** munkáját.

Köszönetet mondok valamennyi orvostársamnak, akik mellettem álltak és állnak a tudományos, gyógyító és oktató munkában.

Köszönetet mondok a technikai segítségért Oláhné Sallai Ágnesnek, Koszorús Lászlónénak, Kecskés Csabánénak, Gyimesi Rékának, Táboriné Varga Andreának, Czibere Eszternek.

IX. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke

Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények:

- 1./ **Szegedi A**, Irinyi B, Bessenyei B, Hunyadi J, Semsei I.: UVB light and 17- β -estradiol have different effects on the mRNA expression of Ro/SSA and La/SSB autoantigens in HaCaT cells. *Arch. Derm. Res.* 2001: 193: 275-282.
Impakt faktor: 1,425
- 2./ Aleksza M, Irinyi B, Lukács A, Antal-Szalmás P, Hunyadi J, **Szegedi A.**: Increased frequency of intracellular IL-13 and IL-10, but not IL-4 expressing CD4⁺ and CD8⁺ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2002: 147: 1135-1141.
Impakt faktor: 2,696
- 3./ Irinyi B, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Sipka S, Hunyadi J, **Szegedi A.**: Cytokine production of CD4⁺ and CD8⁺ peripheral T lymphocytes in patients with chronic idiopathic urticaria. *Act. Derm. Vener.* 2002: 82: 249-253.
Impakt faktor: 1,58
- 4./ **Szegedi A**, Aleksza M, Gonda A, Irinyi B, Sipka S, Hunyadi J, Antal-Szalmás P.: Elevated rate of Thelper1 (T_H1) lymphocytes and serum IFN- γ levels in psoriatic patients. *Immunology Letters* 2003: 86: 277-280.
Impakt faktor: 1,71
- 5./ Kovács A, Schmidt E, Bégány Á, Hunyadi J, **Szegedi A.**: Immunohistochemical examination of P-cadherin in bullous and acantholytic skin diseases. *Act. Derm. Vener.* 2003: 83: 1-4.
Impakt faktor: 1,558
- 6./ Gyimesi E, Sipka S, Dankó K, Kiss E, Hídvégi B, Gál M, Hunyadi J, Irinyi B, **Szegedi A.**: Basophil CD63 expression assay on highly sensitised atopic donor leukocytes- a useful method in chronic autoimmune urticaria. *Br. J. Dermatol.* 2004: 151: 388-396.
Impakt faktor: 2,445
- 7./ Aleksza M, **Szegedi A**, Antal-Szalmás P, Irinyi B, Gergely L, Ponyi A, Hunyadi J, Sipka S, Zeher M, Szegedi Gy, Dankó K.: Altered cytokine expression of whole blood Thelper and Tcytotoxic lymphocytes of patients suffering from polymyositis and dermatomyositis. *Ann Rheum Dis.* 2005: 64: 485-1489. **(megosztott elsőszervezős közlemény)**
Impakt faktor: 6,956
- 8./ **Szegedi A**, Simics E, Aleksza M, Horkay I, Gaál K, Sipka S, Hunyadi J, Kiss E.: Ultraviolet-A1 Phototherapy Modulates Th₁/Th₂ and Tc₁/Tc₂ Balance in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatology* 2005: 44: 925-931.
Impakt faktor: 4,226

9./ **Szegedi A**, Irinyi B, Gál M, Hunyadi J, Dankó K, Kiss E, Sipka S, Gyimesi E.: Significant correlation between the CD63 assay and the histamine release assay in chronic urticaria. *Br. J. Dermatol.* 2006: 155: 1. 67-75.

Impakt faktor: 3,334

10./ Sümegi A, **Szegedi A**, Irinyi B, Gaál M, Hunyadi J, Antal-Szalmás P.: Altered serum concentration and altered expression of the components of the CD14/TLR complex on the peripheral leukocytes of patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007: 143: 3. 177-84. **(megosztott elsőszerezős közlemény)**

Impakt faktor: 2,524

11./ Irinyi B, Széles Gy, Gyimesi E, Tumpek J, Ádány R, Herédi E, Hunyadi J, **Szegedi A**.: Clinical and laboratory investigations in chronic urticaria patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007: 144: 3. 217-225.

Impakt faktor: 2,524

12./ **Szegedi A**, Páyer E, Czifra G, Tóth BI, Schmidt E, Kovács L, Blumberg PM, Bíró T: Protein kinase C isoenzymes differentially regulate the differentiation-dependent expression of adhesion molecules in human epidermal HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2007. közlésre elküldve

Hazai magyar nyelvű folyóiratban megjelent közlemények:

1./ **Szegedi A**, Bakos B, Hunyadi J, Sebők P, Semsei I.: Az UV sugárzás hatása az La és Ro antigén mRNS-ek expressziójára humán keratinocitákban, kapcsolata autoimmun betegségekkel. *Bőrgyógy. Ven. Szle.* 1998: 74: 3. 107-111.

2./ **Szegedi A**, Irinyi B, Hunyadi J.: A krónikus urticaria. *Bőrgyógy. Ven. Sz.* 2002: 78: 3. 101-106.

3./ Irinyi B, Aleksza M, Antal-Szalmás P, Sipka S, Hunyadi J, **Szegedi A**.: Citokin szintek vizsgálata krónikus idiopátiás urticariában szenvedő betegekben. *Bőrgyógy. Ven. Sz.* 2003: 79: 1. 3-7.

4./ **Szegedi A**, Aleksza M, Irinyi B, Hunyadi J.: Az atopiás dermatitis immunológiai háttere. *Bőrgyógy. Ven. Sz.* 2004: 80: 3. 133-137.

5./ **Szegedi A**, Irinyi B, Csuth Á, Tengely É, Hunyadi J, Sipka S, Gyimesi E.: A bazofil aktivációs teszt és a hisztamin felszabadulás mérés összehasonlító vizsgálata a krónikus autoimmun urticaria diagnosztikájában. *Bőrgyógy. Ven. Sz.* 2006: 82: 3. 119-125.

6./ **Szegedi A**, Nagy G, Baráth S, Gaál J.: A D3 vitamin immunmoduláló hatása. *Magyar Immunológia.* 2007: 6: 1-2. 4-10.

7./ **Szegedi A**, Irinyi B, Gál M, Hunyadi J.: A levocetirizin hatékonyságának vizsgálata krónikus urticariás betegekben. *Allergológia és Klinikai immunológia.* 2007: 10: 1. 34-39.

8./ **Szegedi A**, Kiss F, Gaál J: Psoriasis napjainkban. *Lege Artis Medicinae*. 2007. közlésre elfogadva

9./ Antal-Szalmás P, Aleksza M, Gonda A, Herédi E, Sipka S, Hunyadi J, **Szegedi A**: A Th1/Th2 és Tc1/Tc2 sejtek arányának és abszolút sejtszámának változása psoriasisos betegek vérmintáiban. *Magyar Immunológia*. 2007. közlésre elfogadva

10./Gaál J, Lakos G, Szodoray P, Aleksza M, Kiss J, Horváth I, Horkay E, Nagy G, **Szegedi A**.: Az alphacalcidol klinikai és immunológiai hatásainak vizsgálata psoriasisos arthropathiás betegekben. *Magyar Immunológia*. 2007. közlésre elfogadva

X. Irodalomjegyzék

- (1) Levy RM, Gelfand JM, Yan AC: The Epidemiology of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 21:109-115.2003 .
- (2) Kuhnyár Á, Hunyadi L, Kósa L, Szabó I: Az atópiás dermatitis előfordulási gyakoriságának vizsgálata a Szabolcs-Szatmár-Bereg megyében élő 19 év alatti lakosok körében. *Gyermekegyógyászat* 56(4):419-425.2005 .
- (3) Harangi F, Hartmann A, Lőrinczy K, Scheider I, Sebők B: Prevalence of atopic dermatitis in school children of Baranya country. *Orvosi Hetilap* 144:423-433.2003 .
- (4) Leung DYM: Atopic dermatitis :New insights and opportunities for therapeutic intervention. *Clinics in Dermatol* 105(5):860-876.2000 .
- (5) Kang K, Stevens SR: Pathophysiology of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 21:116-121.2003 .
- (6) Larsen FS, Holm NV, Henningsen K: Atopic dermatitis: A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 15:487-494.1986 .
- (7) Schultz LF: Atopic dermatitis: a genetic epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol* 28:719-723.1993 .
- (8) Uehara M, Kimura C: Descendant family history of atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* 73:62-63.1993 .
- (9) Abramovits W: Atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53:S86-S93.2005 .
- (10) Novak N, Bieber T, Leung DYM: Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 112:S128-S139.2003 .
- (11) Lee Y-A, Wahn U, Kehrt R, Tarani L, Businco L, Gustafsson D et al. : A major susceptibility locus for atopic dermatitis maps to chromosome 3q21. *Nat Genet* 26(4):470-473.2000 .
- (12) Kawashima T, Noguchi E, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Nakagawa H, Otuska F et al. : Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 35(6):502-504.1998 .
- (13) Forrest S, Dunn K, Elliott K, Fitzpatrick E, Fullerton J, McCarthy M et al. : Identifying genes predisposing to atopic eczema. *Clinics in Dermatol* 104(5):1066-1070.1999 .
- (14) Fölster-Holst R, Moisis HW, Yang L, Fritsch W, Weissenbach J, Christophers E: Linkage between atopy and the IgE high-affinity receptor gene at 11q13 in atopic dermatitis families. *Him Genet* 102:236-239.1998 .
- (15) Beyer K, Renate N, Fridhoff L, Björkstén B, Huang S-K, Barnes KC et al. : Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers. *J Invest Dermatol* 115(5):906-908.2000 .
- (16) Mao XQ, Shirakawa T, Yoshikawa T, Kawai M, Sasaki S, Enomoto T et al. : Association between genetic variants of mast-cell chymase and eczema. *Lancet* 348:581-583.1998 .
- (17) Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE et al. : Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27(4):372-373.2001 .
- (18) Jirapongsananuruk O, Hofer MF, Trumble AE, Norris DA, Leung DYM: Enhanced expression of B 7.2 (CD86) in patients with atopic dermatitis: a potential role in the modulation of IgE synthesis. *J Immunol* 160:4622-4627.1998 .
- (19) Ohki O, Yokozeki H, Katayama I, Umeda T, Azuma M, Okumura K et al. : Functional CD86 (B7.2/B70) is predominantly expressed on Langerhans cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 136:838-845.1997 .
- (20) Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G: High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 115(3):406-413.2000 .
- (21) Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP et al. : Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics* 38(4):441-446.2006 .
- (22) Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-340.2005 .
- (23) Listwan P, Rothnagel JA: Keratin bundling proteins. *Methods Cell Biol* 78:817-827.2004 .
- (24) Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM: Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29:9432-9440.1990 .
- (25) Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y et al. : Loss-of function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 38(3):337-342.2006 .
- (26) Walley AJ, Chavanas S, Moffatt MF, Esnouf RM, Ubhi B, Lawrence R et al. : Gene polymorphism in Netherton and common atopic disease. *Nat Genet* 29(2):175-178.2001 .
- (27) Singh VK, Mehrotra S, Agarwal SS: The paradigm of Th1 and Th2 cytokines: its relevance to autoimmunity and allergy. *Immunol Res* 20:147-161.1999 .
- (28) Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT: Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Current opinion in Immunol* 15:627-633.2003 .
- (29) Renz H, Jujo K, Bradley KL, Domenico J, Gelfand EW, Leung DY: Enhanced IL-4 production and IL-4 receptor expression in atopic dermatitis and their modulation by interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 99:403-407.1992 .

- (30) Jujo K, Renz H, Abe J, Gelfand EW, Leung DY : Decreased interferon gamma and increased interleukin-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *Clinics in Dermatol* 90:323-330.1992 .
- (31) Katsunuma T, Kawahara H, Yuki K, Akasawa A, Saito H : Impaired interferon-gamma production in a subset population of severe atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 134:240-247.2004 .
- (32) Simon D, Von Gunten S, Borelli S, Braathen LR, Simon HU : The interleukin-13 production by peripheral blood T cells from atopic dermatitis patients does not require CD2 costimulation. *Int Arch Allergy Immunol* 132:148-155.2003 .
- (33) Kaminishi K, Soma Y, Kawa Y, Mizoguchi M : Flow cytometric analysis of IL-4, IL-13 and IFN-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells and detection of circulating IL-13 in patients with atopic dermatitis provide evidence for the involvement of type 2 cytokines in the disease. *J Dermatol Sci* 29:19-25.2002 .
- (34) Antunez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-Garcia JA, Santamaria-Babi LF, Blanca M : Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 34:559-566.2004 .
- (35) Soter NA : Morphology of atopic eczema. *Allergy* 44 Suppl(9):16-19.1989 .
- (36) Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS : Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 389:978-981.1997 .
- (37) Akdis CA, Akdis M, Simon HU, Blaser K : Regulation of allergic inflammation by skin-homing T cells in allergic eczema. *Int Arch Allergy Immunol* 118(2-4):140-144.1999 .
- (38) Gleich GJ, Leiferman KM : Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *Clinics in Dermatol* 105(4):651-663.2000 .
- (39) Pucci N, Lombardi E, Novembre E, Farina S, Bernardini R, Rossi E et al. : Urinary eosinophil protein X and serum eosinophil cationic protein in infants and young children with atopic dermatitis: correlation with disease activity. *Clinics in Dermatol* 105:353-357.2000 .
- (40) Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DYM : Differential in situ cytokine gene expression in acute vs chronic atopic dermatitis. *J Clin Invest* 94:870-876.1994 .
- (41) Hamid Q, Naseer T, Mindhall EM, Song YL, Boguniewicz M, Leung DYM : In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 98:225-231.1996 .
- (42) Adkis M, Simon H-U, Wieng L, Kreyden O, Blaser K, Adkis CA : Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8+ cells respond to superantigen contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 163:466-475.1999 .
- (43) Romagnani S : Regulation of Th2 development in allergy. *Curr Opin Immunol* 6:838-846.1994 .
- (44) Martinez FD : The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Resir Res* 2:129-132.2001 .
- (45) Romagnani S : The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112:352-363.2004 .
- (46) Yazdanbakhah M, Kremsner PG, van Ree R : Allergy parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296:490-494.2002 .
- (47) Bach JF : The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New Engl J Med* 347:911-920.2002 .
- (48) Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL : The germless allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Rev Immunol* 1:69-75.2001 .
- (49) Pulendran B : Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol Rev* 199:227-250.2004 .
- (50) Gogolák P, Réthi B, Hajas G, Rajnavölgyi É : Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J Mol Recognit* 16:299-317.2003 .
- (51) Janeway CA, Medzhitov R : Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.2002 .
- (52) Medzhitov R, Janeway CA : Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89-97.2000 .
- (53) Takeda K, Kaisho T, Akira S : Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.2003 .
- (54) Akira S, Takeda K, Kaisho T : Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-682.2001 .
- (55) Novak N, Bieber T : The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53:S171-S176.2005 .
- (56) Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberkost J, Kraft S et al. : FcεRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *Clinics in Dermatol* 113:949-957.2004 .
- (57) Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M et al. : Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 119:1096-1102.2002 .
- (58) Stary G, Bangert C, Stingl G, Kopp T : Dendritic Cells in Atopic Dermatitis: Expression of FcεRI on Two Distinct Inflammation-Associated Subsets. *Int Arch Allergy Immunol* 138:278-290.2005 .
- (59) Beissert S, Schwarz A, Schwarz T : Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* 126:15-24.2006 .
- (60) Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DYM : T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *Clinics in Dermatol* 113:756-763.2004 .

- (61) Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen DJ, Knol EF et al. : Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *Clinics in Dermatol* 117:176-183.2006 .
- (62) Giménez JCM : Atopic dermatitis. *Allergol Immunol Clin* 15:279-295.2000 .
- (63) Pastore S, Fanale-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest* 99:3009-3017.1997 .
- (64) Mascia F, Mariani G, Pastore S : Blockade of the EGF receptor induces a deranged chemokine expression in keratinocytes leading to enhanced skin inflammation. *Am J Pathol* 163:303-312.2003 .
- (65) Bilsborough J, Leng DY, Maurer M, Howell M, Boguniewicz M, Yao L et al. : IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 117:418-425.2006 .
- (66) Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarsci A, Soto H, Kemeny L et al. : IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *Clinics in Dermatol* 117:411-417.2006 .
- (67) Akdis M, Akdis CA, Weigl L, Disch R, Blaser K : Skin-homing, CLA+ memory T cells are activated in atopic dermatitis and regulate IgE by an IL-13-dominated cytokine pattern. *The J Immunol* 159:4611-4619.1997 .
- (68) Grewe M, Carla AFM, Bruijnzeel-Koomen CA, Schöpf E, Thepen T, Langeveld-Wildschut AG et al. : A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology today* 19(8):359-361.1998 .
- (69) Shimizu M, Matsuda A, Yanagisawa K, Ebe K, Inomata N, Obara K et al. : Functional SNPs in the distal promoter of the ST2 gene are associated with atopic dermatitis. *Him Mol Genet* 14:2919-2927.2005 .
- (70) Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK et al. : IL-33 an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.2005 .
- (71) Leung DYM : Atopic dermatitis and the immune system: the role of superantigens and bacteria. *J Am Acad Dermatol* 45:S13-S16.2001 .
- (72) Leung DYM, Harbeck R, Bina P, Reiser RF, Yang E, Norris DA et al. : Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 92(3):1374-1380.1993 .
- (73) Cole GW, Silverberg NL : The adherence of *Staphylococcus aureus* to human keratinocytes. *Arch Dermatol* 122(2):166-169.1986 .
- (74) Morishita Y, Tada J, Sato A, Toi Y, Kanzaki H, Akiyama H et al. : Possible influences of *Staphylococcus aureus* on atopic dermatitis- the colonizing features and the effects of staphylococcal enterotoxins. *Clin Exp Allergy* 29(8):1110-1117.1999 .
- (75) Leung DYM : Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 104(3):99-108.1999 .
- (76) De Vries IJ, Langeveld-Wildschut EG, von Reijssen FC, Dubois GR, van den Hoek JA, Bihari IC et al. : Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: effects of TNF-alpha and IL-4. *Allergy Clin Immunol* 102(3):461-468.1998 .
- (77) Breuer K, Kapp A, Werfel T : Bacterial infections and atopic dermatitis. *Allergy* 56:1034-1041.2001 .
- (78) Valenta R, Seiberler S, Nattler S, Mahler V, Mossabeh R, Ring J et al. : Autoallergy: a pathogenetic factor in atopic dermatitis? *Clinics in Dermatol* 105(3):432-437.2000 .
- (79) Kimoto M, Nagasawa K, Miyake K : Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide. *Scand J Infect Dis* 35:568-572.2003 .
- (80) Hallmann M, Ramet M, Ezekowitz RA : Toll-like receptor as sensors of pathogens. *Pediatr Res* 50(3):315-321.2001 .
- (81) Zhang G, Ghosh S : Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107(1):13-19.2001 .
- (82) Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K et al. : A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the INF- β promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169(12):6668-6672.2002 .
- (83) Oshiumi H, Mastumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T : TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon- β induction. *Nat Immunol* 4(2):161-167.2003 .
- (84) Szegedi Gy : A Toll-receptorok és az epithelialis sejtek. *Magyar Immunológia* 3(2):4-8.2004 .
- (85) Novak N, Bieber T : Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *Clinics in Dermatol* 112:252-262.2003 .
- (86) Wuthrich B : Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens. *Dermatologica* 178:51-53.1989 .
- (87) Schafer T, Dockery D, Kramer U, Behrendt H, Ring J : Experiences with the severity scoring of atopic dermatitis in a population of German preschool children. *Br J Dermatol* 1997 137:558-562 .
- (88) Schafer T, Heinrich J, Wjst M, Adam H, Ring J, Wichmann HE : Association between severity of atopic eczema and degree of sensitization to aeroallergens in schoolchildren. *Clinics in Dermatol* 104:1280-1284.1999 .
- (89) Akdis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S et al. : Role of T cell and cytokines in the intrinsic form of atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 28:37-44.1999 .
- (90) Adkis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S et al. : T cells and T cell-derived cytokines as pathogenic factors in the nonallergic form of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 113:628-634.1999 .

- (91) Kági MK, Wütrich B, Montano E, Barandun J, Blaser K, Walker C : Differential cytokine profiles in peripheral blood lymphocyte supernatants and skin biopsies from patients with different forms of atopic dermatitis, psoriasis, and normal individuals. *Int Arch Allergy Immunol* 103(4):332-340.1994 .
- (92) Novak N, Kruse S, Kraft S, Geiger E, Kluken H, Fimmers R et al. : Dichotomic nature of atopic dermatitis reflected by combined analysis of monocyte immunophenotyping and single nucleotide polymorphisms of the interleukin-4/interleukin-13 receptor gene: the dichotomy of extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 119(4):870-875.2002 .
- (93) Schmid P, Simon D, Simon H-U, Akdis CA, Wüthrich B : Epidemiology, clinical features, and immunology of the „intrinsic” (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). *Allergy* 56:841-849.2001 .
- (94) Novembre E, Cianferoni A, Lombardi E, Bernardini R, Pucci N, Vierucci A : Natural history of „intrinsic” atopic dermatitis. *Allergy* 56:525-531.2001 .
- (95) Novak N, Allam JP, Bieber T : Allergic hyperreactivity to microbial components: a trigger factor of „intrinsic” atopic dermatitis. *Allergy Clin Immunol* 112(1):215-216.2003 .
- (96) Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM: Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64: ii18- ii23. 2005.
- (97) Capon F, Munro M, Barker J, Trembart R : Searching for the major histocompatibility complex psoriasis susceptibility gene. *J Invest Dermatol* 118:745-751.2002 .
- (98) Burden AD, Javed S, Bailey M, Hodgins M, Connor M, Tilman D : Genetics of psoriasis: paternal inheritance and a locus on chromosome 6p. *J Invest Dermatol* 110:958-960.1998 .
- (99) Sonkoly E, Bata-Csörgő Z, Pivarcsi A, Polyanka H, Kenderessy-Szabo A, Molnar G et al. : Identification and characterization of a novel psoriasis susceptibility-related noncoding RNA gene, PRINS. *J Biol Chem* 280:24159-24167.2005 .
- (100) Nikoloff BJ : The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 135:1104-1110.1999 .
- (101) Griffiths CEM, Iaccarino L, Naldi L, Olivieri I, Pipitone N, Salvarani C et al. : Psoriasis and psoriatic arthritis: immunological aspects and therapeutic guidelines. *Clin Exp Rheumatol* 24(suppl 40):S72-S78.2006 .
- (102) Nikoloff BJ, Nestle FO : Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113:1664-1675.2004 .
- (103) Gyullai R, Kemény L : A pikkelysömör immunológiája: az alapkutatásoktól a betegágyig. *Orvosi Hetilap* 147(46):2213-2220.2006 .
- (104) Bata-Csörgő Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD : Flow cytometric identification of proliferative subpopulations within normal human epidermis and the localization of the primary hyperproliferative population in psoriasis. *J Exp Med* 178:1271-1281.1993 .
- (105) Bata-Csörgő Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper KD : Kinetics and regulation of human keratinocyte stem cell growth factors from psoriasis lesional T lymphocytes stimulate proliferation among psoriatic uninvolved, but not normal, stem keratinocytes. *J Clin Invest* 95:317-327.1995 .
- (106) Sugiyama H, Gyullai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR et al. : Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25 high regulatory T cells in psoriasis? mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174:164-173.2005 .
- (107) Bonifati C, Ameglio F : Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 38:241-251.1999 .
- (108) Bos JD, de Rie MA : The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 20:40-46.1999 .
- (109) Kemeny L, Michel A, Dobozy A, Ruzicka T : Cytokine target as a potential target for antipsoriatic therapy. *Exp Dermatol* 3:1-8.1994 .
- (110) Brown DW, Baker BS, Ovigne J, Hardman C, Powles AV, Fry L : Skin CD4+ T cells produce interferon-gamma in vitro in response to streptococcal antigens in chronic plaque psoriasis. *J Invest Dermatol* 114:576.2000 .
- (111) Ovigne JM, Baker BS, Brown DW, Powles AV, Fry L : Epidermal CD8+ T cells in chronic plaque psoriasis are Tc1 cells producing heterogeneous levels of interferon-gamma. *Exp Dermatol* 10:168.2001 .
- (112) Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, Bata-Csorgo Z, Cooper KD : Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4 and CD8 subsets. *J Invest Dermatol* 111:1072.1998 .
- (113) Asadullah K, Sterry W, Stephanek K, Jasulaitis D, Leupold M, Audring H et al. : IL10 is a key cytokine in psoriasis. *J Clin Invest* 101:783.1998 .
- (114) Asadullah K, Friedrich M, Hanneken S, Rohrbach C, Audring H, Vergopoulos A et al. : Effects of systemic interleukin-10 therapy on psoriatic skin lesions: histologic, immunohistologic, and molecular biology findings. *J Invest Dermatol* 116:721.2001 .
- (115) Schmid P, Cox D, McMaster G, Itin P : In situ hybridization analysis of cytokine, protooncogene and tumour suppressor gene expression in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 285:334-340.1993 .
- (116) Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ : The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 101:701-705.1993 .
- (117) Vollmer S, Menssen A, Trommler P, Schendel D, Prinz JC : T lymphocytes derived from skin lesions of patients with psoriasis vulgaris express a novel cytokine pattern that is distinct from that of T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 24:2377-2382.1994 .

- (118) Friedrich M, Krammig S, Henze M, Döcke WD, Sterry W et al. : Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type1 immunophenotype. *Arch Dermatol Res* 292:519-521.2000 .
- (119) Austin L, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG : The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 113:752-759.1999 .
- (120) Maino VC, Picker LJ : Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry* 34:207-215.1998 .
- (121) Antal-Szalmas P, van Strijp JAG, Weersink AJL, Verhoef J, van Kessel JK : Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *Leukoc Biol* 61:721-728.1997 .
- (122) Gladman DD, Farewell VT, Pellett F, Schentag C, Rahman P : HLA is a candidate region for psoriatic arthritis. Evidence for excessive HLA sharing in sibling pairs. *Hum Immunol* 64:887-889.2003 .
- (123) Gladman DD, Anhorn KA, Schachter RK, Mervart H : HLA antigens in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 13:586-592.1986 .
- (124) Hohler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B, Kalzua W, Reuss E, de Vlam K et al. : Differential association of polymorphism in the TNF-alpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 61:213-218.2002 .
- (125) Veale D, Ritchlin C, FitzGerald O : Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 65(suppl 2):ii26-ii29.2005 .
- (126) Mease P : TNF alpha therapy in psoriatic arthritis and psoriasis. *Ann Rheum Dis* 63:755-758.2004 .
- (127) Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L : Psoriasis a T-cell-mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunol Today* 16:145-149.1995 .
- (128) Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboul L, Chevalier X : Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 60:316-321.2001 .
- (129) Costello P, Bresnihan B, O'Farrelly C, FitzGerald O : Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 26:1117-1124.1999 .
- (130) Paukkonen R, Naukarinen A, Horsmanheimo M : The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8+ T cells and CD11c+ macrophages into the epidermis. *Arch Dermatol Res* 284:375-379.1992 .
- (131) Winchester R, Brancato L, Itescu S, Skovron ML, Solomon G : Implications from the occurrence of Reiter's syndrome and related disorders in association with advanced HIV infection. *Scand J Rheumatol Suppl* 74:89-93.1988 .
- (132) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342.2003 .
- (133) Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM : Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 111:821-831.2003 .
- (134) Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL : TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106:1481-1488.2000 .
- (135) Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. : The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13:325-349.1998 .
- (136) Norman AW, Ishizuka S, Okamura WH : Ligands for the vitamin D endocrine system different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptor or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:49-59.2001 .
- (137) Carlberg C, Polly P : Gene regulation by vitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8:19-42.1998 .
- (138) Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF : Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 374:334-338.2000 .
- (139) Hewison M, Freeman L, Hughes SV, Evans KN, Bland R, Eliopoulos AG et al. : Differential regulation of Vitamin D receptor and its ligands in human monocyte derived dendritic cells. *J Immunol* 170(11):5382-5390.2003 .
- (140) Penna G, Adorini L : 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 164(5):2405-2411.2000 .
- (141) Van Halteren AG, Tysma OM, van Etten E, Mathieu C, Roep BO : 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 or analogue treated dendritic cells modulate human autoreactive T cells via the selective induction of apoptosis. *J Autoimmun* 23(3):233-239.2004 .
- (142) D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, DiLucia P, Lang R et al. : Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 101(1):252-262.1998 .
- (143) Koren R, Ravid A, Rotem C, Shohami E, Liberman UA, Novogrodsky A : 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances prostaglandin E2 production by monocytes, A mechanism which partially accounts for the antiproliferative effect of 1,25 (OH)2D3 on lymphocytes. *FEBS Lett* 205(1):113-116.1986 .
- (144) Cippitelli M, Fionda C, Di Bona D, Di Rosa F, Lupo A, Piccoli M et al. : Negative regulation of CD95 ligand gene expression by Vitamin D3 in T lymphocytes. *J Immunol* 168(3):1154-1166.2002 .
- (145) Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S : Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol* 160(1):209-218.1998 .

- (146) Boomstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Gaara A : 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167(9):4974-4980.2001 .
- (147) Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R : Prevention of type I diabetes in NOD mice by nonhypercalcemic doses of a new structural analog of 1,25-dihydroxyvitamin D3, KH106. *Endocrinology* 136:866-872.1995 .
- (148) Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R : Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Diabetologia* 37(6):552-558.1994 .
- (149) Van Amerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH : Multiple sclerosis and vitamin D, an update. *Eur J Clin Nutrition* 58:1095-1109.2004 .
- (150) van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV et al. : Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case control study. *BMJ* 327:316.2003 .
- (151) Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT : Cytoline profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation. *J Neuroimmunol* 134:128-132.2003 .
- (152) Auer DP, Schumann EM, Kumpfel T, Gossel C, Trenkwalder C : Seasonal fluctuations of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47:276-277.2000 .
- (153) Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG : Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis :results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum* 50:72-77.2004 .
- (154) Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM : Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358:1500-1503.2001 .
- (155) Andreassen H, Rix M, Brot C, Eskildsen P : Regulators of calcium homeostasis and bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 33:1087-1093.1998 .
- (156) Vitale E, Cook S, Sun R, Specchia C, Subramanian K, Rocchi M et al. : Linkage analysis conditional on HLA status in a large North American pedigree supports the presence of a multiple sclerosis susceptibility locus on chromosome 12p1. *Hum Mol Genet* 11:295-300.2002 .
- (157) Martin K, Radlmayr M, Borchers R, Heinzlmann M, Folwaczny C : Candidate genes colocalized to linkage regions in inflammatory bowel disease. *Digestion* 66:121-126.2002 .
- (158) Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, Madacsy L, Tordai A, Tulassay T et al. : Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 147:803-808.2002 .
- (159) Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Nunez-Roldan A : Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet* 28:89-93.2001 .
- (160) Smith EL, Walworth NC, Holick MF : Effect of 1 alpha 25-dihydroxyvitamin D3 on the morfologic and biochemical differentetion of cultured human epidermal keratinocytes grown serum free conditions. *J Invest Dermatol* 86:709-714.1986 .
- (161) Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T : Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by1 alpha 25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* 113:1950-1957.1983 .
- (162) Morimoto S, Kumuhara Y : A patient with psoriasis cured by1 alpha 25-dihydroxyvitamin D. *Med J Osaka Univ* 35:51-54.1985 .
- (163) Morimoto S, Yoshikawa K : Psoriasis and vatamin D3. A review of our experience. *Arch Dermatol* 125:231-234.1989 .
- (164) el-Azhary RA, Peters MS, Pittelkow MR, Kao PC, Muller SA : Efficacy of vitamin D3 derivatives in the treatmant of psoriasis vulgaris: a preliminary report. *Mayo Clin Proc* 68:835-841.1993 .
- (165) Holick MF : Will 1.25-dihydroxyvitamin D. MC 903 and their analogues herald a new pharmacologic era for the treatmant of psoriasis? *Arch Dermatol* 125:1692-1697.1989 .
- (166) Holick MF : Active vitamin D compounds and analogues: A new therapeutic era for dermatology in the 21st Cuntry. *Mayo Clin Proc* 68:925.1993 .
- (167) Barna M, Bos JD, Kapsenberg ML, Snijdwint FG : Effect of calcitriol on the production of T-cell-derived cytokines in psoriasis. *Br J Dermatol* 136:536-541.1997 .
- (168) Komine M, Watabe Y, Shimaoka S, Sato F, Kake K, Nishina H et al. : The action of a novel vitamin D3 analogue, OCT, on immunomodulatory function of keratinocytes and lymphocytes. *Arch Dermatol Res* 291:500-506.1999 .
- (169) Fukuya Y, Higaki M, Higaki Y, Kawashima M : Effect of vitamin D3 on the increased expression of Bcl-xL in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 293:620-625.2002 .
- (170) Chen TC, Turner AK, Holick MF : A method for the determination of the circulating concentrations of 1.25-dihydroxyvitamin D. *J Nutr Biochem* 1:320-327.1990 .
- (171) Perez A, Raab R, Chen TC, Turner A, Holick MF : Safety and efficacy of oral calcitriol (1.25-dihydroxyvitamin D3) for the treatmant of psoriasis. *Br J Dermatol* 134:1070-1078.1996 .
- (172) Huckins D, Felson DT, Holick M : Treatment of psoriatic arthritis with oral 1.25-dihydroxyvitamin D3. A polit study. *Arthritis Rheum* 33:1723-1727.1990 .
- (173) Kanwar AJ, Greaves MW : Approach to the patient with chronic urticaria. *Hosp Pract* 31(3):175-189.1996 .
- (174) O'Donnell BF, Lawlor F, Simpson J, Morgan M, Greaves MW : Chronic urticaria: impact on quality of life. *Br J Dermatol* 136:197-201.1997 .
- (175) Greaves MW : Chronic urticaria. *N Engl J Med* 332:1767-1772.1995 .
- (176) Hellgren L : The prevalencie of urticaria in the total population. *Acta Allergologica* 27:236-240.1972 .
- (177) Juhlin L : Reccurent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *Br J Dermatol* 104:369-381.1981 .

- (178) Sibbald RG, Cheema AS, Lozinski A, Tarlo S : Chronic urticaria: evolution of the role of physical, immunologic, and other contributory factors. *Int Dermatol* 30:381-386.1991 .
- (179) Sabroe A, Greaves MW: The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria. *Arch Dermatol* 133:1003-1007.1997 .
- (180) Husz S: Helyi kezelés a bőrgyógyászatban. Szeged Scriptum Kft, 2001.
- (181) Zuberbier T, Greaves MW, Juhlin L, Kobza BA, Maurer D, Stingl G et al. : Definition, classification, and routine diagnosis of urticaria: a consensus report. *J Invest Dermatol* 6:123-127.2001 .
- (182) Grattan CEH: Autoimmune urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am* 24:163-181.2004 .
- (183) Grattan CE, Sabroe RA, Greaves MW : Chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 46:645-657.2002 .
- (184) Greaves MW : Chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 105:664-672.2000 .
- (185) Hirschmann J, Lawlor F, English SJC, Lowback JB, Winkelmann RK, Greaves MW : Cholinergic urticaria. *Arch Dermatol* 123:462-467.1987 .
- (186) Zuberbier T, Althaus C, Chantraine-Hess H, Czarnetski BM: Prevalence of cholinergic urticaria in young adults. *J Am Acad Dermatol* 31:478-481.1994 .
- (187) Dobozy A, Husz S : Az urticaria és kezelése. *Háziorvos Továbbképző Szemle* 1:371-372.1996 .
- (188) Temesvári E : Élelmiszerallergia-intolerancia. *Gyógyszereink* 43:2-9.1993 .
- (189) Henz BM, Zuberbier T : Most chronic urticaria is food-dependent, and not idiopathic. *Exp Dermatol* 7:139-142.1998 .
- (190) Warin RP: The effect of aspirin in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 72:350-351.1960 .
- (191) Sabroe A, Seed PT, Stat C, Francis DM, Barr RM, Kobza A et al. : Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-Fc RI or anti-IgE autoantibodies. *J Am Acad Dermatol* 40:443-450.1999 .
- (192) Bakos N, Szántó H : A *Helicobacter pylori* patogenetikai szerepe krónikus urticariában. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 74:9-13.1997 .
- (193) Tebbe B, Gielen CC, Schulzke JD, Bojarski C, Radenhausen M, Orfanos CE : *Helicobacter pylori* infection and chronic urticaria. *J Am Acad Dermatol* 34:685-686.1996 .
- (194) Ozkaya-Bayazit E, Demir K, Ozguroglu E, Kaymakoglu S, Ozamagan G : *Helicobacter pylori* eradication in patients with chronic urticaria. *Arch Dermatol* 134:1165-116.1998 .
- (195) Schnyder B, Helbing A, Picher WJ : Chronic idiopathic urticaria: natural course and association with *Helicobacter pylori* infection. *Int Arch Allergy Immunol* 119:60-83.1999 .
- (196) Liutu M, Kalimo K, Uksila J, Kalimo H : Etiological aspects of chronic urticaria. *Int J Dermatol* 37:515-519.1998 .
- (197) Krishnaswamy G, Youngberg G : Acute and chronic urticaria. *Postgraduate Medicine* 109:107-123.2001 .
- (198) Mehregan DR, Hall MJ, Gibson LE : Urticarial vasculitis: a histopathologic and clinical review of 72 cases. *J Am Acad Dermatol* 26(3 Pt 2):441-448.1992 .
- (199) Laman SD, Provost TT : Cutaneous manifestations of lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 20:195-212.1994 .
- (200) Morita A, Sakakibara S, Yokota M, Tsuji T : A case of urticarial vasculitis associated with macroglobulinemia (Schnitzler's sy). *J Dermatol* 22:32-35.1995 .
- (201) Daoud MS, Gibson LE, Daoud S, el Azhary RA : Chronic hepatitis C and skin diseases: a review. *Mayo Clin Proc* 70:559-564.1995 .
- (202) Grattan CEH, Wallington TB, Warin RP : A serological mediator in chronic idiopathic urticaria- a clinical, immunological and histological evaluation. *Br J Dermatol* 114:583-590.1986 .
- (203) Grattan CEH, Francis DM, Hide M, Greaves MW : Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 21:695-704.1991 .
- (204) Hide M, Francis DM, Grattan CEH, Hakimi J, Kochan JP, Greaves MW : Autoantibodies against the high-affinity IgE receptor as a cause of histamine release in chronic urticaria. *N Engl J Med* 328:1599-1604.1993 .
- (205) Hide M, Francis DM, Grattan CEH, Barr RM, Winkelmann RK, Greaves MW : The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria: new evidence suggests an auto-immune basis and implications for treatment. *Clin Exp Allergy* 24:624-627.1994 .
- (206) Fiebiger E, Maurer D, Holubar H, Reininger B, Hartmann G, Woitschlanger M et al. : Serum IgG autoantibodies directed against the alpha chain of FcεRI: a selective marker and pathogenetic factor for a distinct subset of chronic urticaria patients. *J Clin Invest* 96:2606-2612.1995 .
- (207) Fiebiger E, Hammerschmid F, Stingl G, Maurer D : Anti- FcεRIα autoantibodies in autoimmune-mediated disorders: identification of a structure-function relationship. *J Clin Invest* 101:243-251.1998 .
- (208) Zweiman B, Valenzano M, Atkiss PC, Tanus T, Getsy JA : Characteristics of histamine-releasing activity in the sera of patients with chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 98:89-98.1996 .
- (209) Tong LJ, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet J-P, Kaplan AP : Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 99:461-465.1997 .
- (210) Erdei A, Gergely J, Rajnavölgyi É, László G, Sármay G. *Immunbiológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Rt., 2000.
- (211) Kikuchi Y, Kaplan AP : Mechanism of autoimmune activation of basophils in chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 107:1056-1062.2001 .

- (212) Lowman MA, Rees PH, Benyon RC : Human mast cell heterogeneity. Histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils, and colon in response to IgE-dependent and non-immunological stimuli. *Clinics in Dermatol* 81:590-597.1988 .
- (213) Füreder WA, Willheim M, Bankl HC, Maier U, Kishi K, Müller MR et al. : Differential expression of complement receptors on human basophils and mast cells. Evidence for mast cell heterogeneity and CD88/C5aR expression on skin mast cells. *J Immunol* 155:3152-3160.1995 .
- (214) Niimi N, Francis DM, Kermani F, Black AK, Barr RM, Grattan CEH et al. : Dermal mast cell activation by autoantibodies against the high affinity IgE receptor in chronic urticaria. *J Invest Dermatol* 106:1001-1006.1996 .
- (215) Grattan, Francis DM, Slater NGP, Greaves MW : Plasmapheresis for severe unremitting chronic urticaria. *Lancet* 339:1078-1080.1992 .
- (216) O'Donnell BF, Barr RM, Kobza-Black AK, Francis DM, Kermani F, Niimi N et al. : Intravenous immunoglobulin in autoimmune chronic urticaria. *Br J Dermatol* 138(1):101-106.1998 .
- (217) Grattan CEH, Francis DM : Autoimmune urticaria. *Adv Dermatol* 15:311-340.1999 .
- (218) Horn MP, Gerster T, Ochensberger B, Derer T, Kricek F, Jouvin MH KJ et al. : Human anti- FcεRIα autoantibodies isolated from healthy donors cross-react with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 29(4):1139-1148.1999 .
- (219) Horn MP, Pachlopnik JM, Vogel M, Dahinden M, Wurm F, Stadler BM et al. : Conditional autoimmunity mediated by human natural anti- FcεRIα autoantibodies? *FASEB J Immunol* 15:2268-2274.2001 .
- (220) Li JT, Balakrishnan G, Kochan JP, Kinet JP, Kaplan AP : Assessment of autoimmunity in patients with chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 99:461-465.1997 .
- (221) O'Donnell BF, O'Neill CM, Francis DM, Niimi N, Barr RM, Barlow RJ et al. : Human leukocyte antigen class II associations in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 140:853-858.1999 .
- (222) Leznoff A, Josse RG, Denburg J, Dolovich J : Association of chronic urticaria and angioedema with thyroid autoimmunity. *Arch Dermatol* 119:636-640.1983 .
- (223) O'Donnell BF, Francis DM, Swana GT, Seed PT, Kobza BA, Greaves MW : Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 153:331-335.2005 .
- (224) Grattan CEH, O'Donnell BF, Francis DM, Niimi N, Barlow RJ, Seed PT et al. : Randomised double-blind study of cyclosporin in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 143(2):365-372.2000 .
- (225) Sabroe RA, Poon E, Orchard GE, Lane D, Francis DM, Barr RM et al. : Cutaneous inflammatory cell infiltrate in chronic idiopathic urticaria: Comparison of patients with and without anti- FcεRIα or anti-IgE autoantibodies. *Clinics in Dermatol* 103:484-493.1999 .
- (226) Yin S, Kikuchi Y, Meng Q, Kay AB, Kaplan AP : Th1/Th2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *Clinics in Dermatol* 109:694-700.2002 .
- (227) Sabroe RA, Grattan CE, Francis DM, Barr RM, Kobza BA, Greaves MW : The autologous serum skin test a screening test for autoantibodies in chronic idiopathic urticaria. *Br J Dermatol* 140:446-452.1999 .
- (228) Husz S, Mihályi L, Dobozy A : Diagnosztikus problémák autoimmun urticarában. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* 8(1):15-18.2004 .
- (229) Ferrer M, Kinet JP, Kaplan AP : Comparative studies of functional and binding assays for IgG anti- FcεRIα (α-subunit) in chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 101:672-676.1998 .
- (230) Sabroe RA, Fiebiger E, Francis DM, Maurer D, Seed PT, Grattan CE et al. : Classification of anti-FcεRIα and anti-IgE autoantibodies in chronic idiopathic urticaria and correlation with disease severity. *Clinics in Dermatol* 110:492-499.2002 .
- (231) Kaplan AP : Chronic urticaria: Pathogenesis and treatment. *Clinics in Dermatol* 114:465-474.2004 .
- (232) Asero R, Lorini M, Chong SU, Zuberbier T, Tedeschi A : Assessment of histamine-releasing activity of sera from patients with chronic urticaria showing positive autologous skin test on human basophils and mast cells. *Clin Exp Allergy* 34:1111-1114.2004 .
- (233) Koch PJ, Franke WW : Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 6:682-687.1994 .
- (234) Garrod DR, Merritt A, Nie Z : Desmosomal adhesion: structural basis, molecular mechanism and regulation. *Mol Memb Biol* 19:81-94.2002 .
- (235) Arnemann J, Sullivan KH, Magee AI, King IA, Buxton RS : Stratification-related expression of isoforms of desmosomal cadherins in human epidermis. *J Cell Sci* 104:741-750.1993 .
- (236) Furukawa F, Takigawa M, Matsuyoshi N, Shirahama S, Wakita H, Fujita M et al. : Cadherins in cutaneous biology. *J Dermatol* 11:802-815.1994 .
- (237) Payne AS, Hanakawa Y, Amagai M, Stanley JR : Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol* 16:536-543.2004 .
- (238) Stanley JR. Pemphigus. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI et al., editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 558-566.2003 .
- (239) Bystryń JC, Rudolph J : Pemphigus. *The Lancet* 366:61-73.2005 .
- (240) Zillikens D, Diaz LA. Autoimmune Bullous Diseases. In: Burg G, Dummer R, editors. *Strategies for immunointervention in dermatology*. Heidelberg: Springer, 217-226.1997 .
- (241) Robledo MA, Prada S, Jamarillo D, Leon W : South American pemphigus foliaceus (SPF): study of an epidemic in „EL Bare and Nichi”, Colombia (1982-1986). *Br J Dermatol* 118:737-744.1988 .

- (242) Mahoney MG, Wang ZW, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR: Explanations for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus foliaceus and vulgaris. *J Clin Invest* 103:461-468.1999 .
- (243) Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869-877.1991 .
- (244) Emery DJ, Diaz LA, Fairly JA, Lopez A, Taylor AF, Giudice GJ: Pemphigus foliaceus and pemphigus vulgaris autoantibodies react with the extracellular domain of desmoglein. *J Invest Dermatol* 104:323-328.1995 .
- (245) Kowalczyk AP, Green KJ, Stanley JR, Hashimoto T, Borgwardt JE, Anderson JE: Pemphigus sera recognize conformationally sensitive epitopes in the amino-terminal region of desmoglein-. *J Invest Dermatol* 105:147-152.1995 .
- (246) Ding X, Fairley JA, Diaz LA, Lopez S, Mascaro JM, Jr., Aoki V: Mucosal and mucocutaneous (generalized) pemphigus vulgaris show distinct autoantibody profiles. *J Invest Dermatol* 109:592-596.1997 .
- (247) Amagi M, Karpati S, Prussick R, Klaus-Kovtun V, Stanley JR: Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. *J Clin Invest* 90:919-926.1992 .
- (248) Bhol K, Ahmed AR, Aoki V, Mohimen A, Nagarwalla N, Natarajan K: Correlation of peptide specificity and IgG subclass with pathogenic and nonpathogenic autoantibodies in pemphigus vulgaris: a model for autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5239-5243.1995 .
- (249) Amagi M, Nishikawa T, Shimizu N, Green KJ, Hashimoto T: Antigen-specific immunoadsorption of pathogenic autoantibodies in pemphigus foliaceus. *J Invest Dermatol* 104:895-901.1995 .
- (250) Amagi M, Tsunoda K, Zillikens D, Nagai T, Nishikawa T: The clinical phenotype of pemphigus is defined by the anti-desmoglein autoantibody profile. *J Am Acad Dermatol* 40:167-170.1999 .
- (251) Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 334:661-665.1988 .
- (252) Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.1992 .
- (253) Jaken S: Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* 8:168-173.1996 .
- (254) Ohno S, Akita Y, Hata A, Osada S, Kubo K, Kohno Y et al.: Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv Enzyme Regul* 31:287-303.1991 .
- (255) Baier G, Telford D, Giampa L, Coggeshall KM, Baier-Bitterlich G, Isakov N et al.: Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 268:4997-5004.1993 .
- (256) Goodnight JA, Mischak H, Mushinski JF: Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* 64:159-209.1994 .
- (257) Decker LV (ed): Protein Kinase C. New York: Oxford Press, 2003.
- (258) Kitajima Y, Aoyama Y, Seishima M: Transmembrane signaling for adhesive regulation of desmosomes and hemidesmosomes, and for cell-cell detachment induced by pemphigus IgG in cultured keratinocytes: involvement of protein kinase C. *Inv Dermatol* 2:137-144.1999 .
- (259) Szegedi Gy, Zeher M, Bakó Gy: Klinikai immunológia. Springer Orvosi Kiadó Kft, 1999.
- (260) Petrányi Gy, Dobozy A, Gergely P, Pálóczi K, Szegedi Gy, Szemere P: Klinikai immunológia. Medicina Könyvkiadó Rt, 2000.
- (261) Clark G, Reichlin M, Tomasi TB: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 102:117-122.1969 .
- (262) McCauliffe DP, Sontheimer RD: Molecular characterization of the Ro/SS-A autoantigens. *J Invest Dermatol* 100:73S-79S.1993 .
- (263) Pruijn GJ, Slobbe RL, Van Venrooij WJ: Structure and function of La and Ro RNPs. *Mol Biol Rep* 14:43-48.1990 .
- (264) Deutscher SL, Harley JB, Keene JD: Molecular analysis of the 60-kDa human Ro ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9479-9483.1988 .
- (265) McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, Sanz I, Hanke J, Newkirk MM et al.: Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *J Clin Invest* 85:1379-1391.1990 .
- (266) Edward K, Chan L, Hamel JC, Buyon JP, Jan EM: Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 87:68-76.1991 .
- (267) Itoh K, Itoh Y, Frank MB: Protein heterogeneity in the human Ro/SS-A ribonucleoproteins. The 52-and 60-kD Ro/SS-A autoantigens are encoded by separate genes. *J Clin Invest* 87:117-186.1991 .
- (268) McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD: A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal cal-1 antigen and an aplysia „memory molecule”. *J Clin Invest* 86:332-335.1990 .
- (269) Scofield RH, Harley JB: Autoantigenicity of a Ro/SS-A is related to a nucleocapsid protein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3343-3347.1991 .
- (270) Semsei I, Tröster H, Bartsch I, Schwemmle M, Igloi GL, Bachmann M: Isolation of rat cDNA clones coding for the autoantigen SS-B/La: detection of species specific variations. *GENE* 126:265-268.1993 .

- (271) Tröster H, Metzger T, Semsei I, Schwemmle M, Winterpacht A, Zabel B et al. : One gene, two transcripts: isolation of an alternative transcript encoding for the autoantigen La/SS-S from a library of patient with primary Sjögrens' syndrome. *J Exp Med* 180:2059-2067.1994.
- (272) LeFeber WP, Norris DA, Ryan SR, Huff JC, Lee LA, Kubo M et al. : Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest* 74:1545-1551.1984.
- (273) Furukawa M, Kashiwara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA : Binding of antibodies to ENA SS-A/Ro and SS-B is induced on the surface of human keratinocytes by UVL: implication for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 94:77-85.1990.
- (274) Furukawa F, Lyons NB, Lee LA, Coulter SN, Norris DA : Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. *J Immunol* 141:1480-1488.1988.
- (275) Tesar TT, Armstrong J : Expression of Ro/SSA and La/SSB on epithelial cell surface following in vitro adenovirus infection. *Arthr Rheum* 37:20.1986.
- (276) Bachmann M, Chang SH, Slor H, Kukules J, Müller WEG : Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after UV irradiation of human keratinocytes. *Exp Cell Res* 191:171-180.1990.
- (277) Dawe RS : Ultraviolet A1 phototherapy. *Br J Dermatol* 148:626-637.2003.
- (278) McGrath H, Jr. : Ultraviolet-A1 irradiation decreases clinical disease activity and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology* 12:129-135.1994.
- (279) Krutmann J, Diepgen TL, Luger TA, Grabbe S, Meffert H, Sönnichsen N et al. : High-dose UVA1 therapy for atopic dermatitis: Results of a multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 38:589-593.1998.
- (280) Plettenberg H, Stege H, Megahed M, Ruzicka T, Hosokawa Y, Tsuji T : Ultraviolet-A1 (340-400 nm) phototherapy for cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 41:47-50.1999.
- (281) Kerscher M, Volkenandt M, Gruss C, Ruether T, Kobyletzki G, Freitag M : Low-dose UV-A1 phototherapy for treatment of localized scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 38:21-26.1998.
- (282) Morita A, Kobayashi K, Isomura I, Tsuji T, Krutmann J : Ultraviolet-A1 (340-400 nm) phototherapy for scleroderma in systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 43:670-674.2000.
- (283) McGrath H, Jr., Bak E, Michalski JP : Ultraviolet-A light prolongs survival and improves immune function in (New Zealand black x New Zealand white) F1 hybrid mice. *Arthritis Rheum* 30:557-561.1987.
- (284) McGrath H, Jr., Bell JM, Haynes MR, Martínez-Osuna P : Ultraviolet-A irradiation therapy for patients with systemic lupus erythematosus: a pilot study. *Current Therapeutic Research* 55(4):373-381.1994.
- (285) McGrath H, Jr., Martínez-Osuna P, Lee FA : Ultraviolet-A1 (340-400 nm) irradiation therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 5:269-274.1996.
- (286) Polderman MCA, Huizinga TWJ, Cessie LS, Pavel S : UVA-1 cold light treatment of SLE: a double blind, placebo controlled crossover trial. *Ann Rheum Dis* 60:112-115.2001.
- (287) Polderman MCA, Cessie LS, Huizinga TWJ, Pavel S : Efficacy of UVA-1 cold light as an adjuvant therapy for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 43:1402-1404.2004.
- (288) Plotz PH, Dalakas M, Lefe RL, Love LA, Miller FW, Cronini ME : Current concepts in the idiopathic inflammatory myopathies polymyositis, dermatomyositis and related disorders. *Ann Intern Med* 111:143-157.1989.
- (289) Plotz PH, Rider LG, Targoff IN, Raben N, O'Hanlon TP, Miller FW : NIH conference. Myositis: Immunologic contributions to understanding cause, pathogenesis, and therapy. *Ann Intern Med* 122:715-724.1995.
- (290) Lundberg I, Ilfgrén AK, Nyberg P, Andersson U, Klareskog L : Cytokine production in muscle tissue of patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 40:865-874.1997.
- (291) Lundberg I, Kratz AK, Alexanderson H, Patarroyo M : Decreased expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and cell adhesion molecules in muscle tissue following corticosteroid treatment in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arth Rheum* 43:336-348.2000.
- (292) Englund P, Nennesmo I, Klareskog L, Lundberg IE : Interleukin-1 alpha expression in capillaries and major histocompatibility complex class I expression in type II muscle fibers from polymyositis and dermatomyositis patients: important pathogenic features independent of inflammatory cell clusters in muscle tissue. *Arth Rheum* 4:1044-1055.2002.
- (293) Lundberg IE : The role of cytokines, chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 3:216-224.2000.
- (294) Mackiewicz Z, Hukkanen M, Povilenaite D, Sukura A, Fonseca JE, Virtanen I et al. : Dual effects of caspase-1, interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and nerve growth factor receptor in inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol* 1:41-48.2003.
- (295) Kuru S, Inukai A, Kato T, Liang Y, Kimura S, Sobue G : Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* 3:217-224.2003.
- (296) Lepidi H, Frances V, Figarella-Branger D, Bartoli C, Machado-Baeta A, Pellisier JF : Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24:73-79.1998.
- (297) Sugiura T, Harigai M, Kawaguchi Y, Takagi K, Fukasawa C, Ohsako-Higami S et al. : Increased IL-15 production of muscle cells in polymyositis and dermatomyositis. *Int Immunol* 8:917-924.2002.
- (298) Hagiwara E, Adams EM, Plotz PH, Klinman N : Abnormal numbers of cytokine producing cells in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clin Exp Rheum* 14:485-491.1996.
- (299) Hanifin JM, Rajka G : Diagnostic features of atopic dermatitis. *Derm Venereol Suppl* 92:44-47.1980.

- (300) Moll JM, Wright V : Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 3:55-78.1973 .
- (301) Bohan A, Peter JB : Polymyositis and dermatomyositis. *N Engl J Med* 292:344-347.1975 .
- (302) Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL : Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:44-48.1995 .
- (303) Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH : Derivation of the SLEDAI. *Arthritis and Rheumatism*:630-640.1992 .
- (304) Kozel MMA, Mekkes JR, Bossuyt PMM, Bos JD : Natural course of physical and chronic urticaria and angioedema in 220 patients. *J Am Acad Dermatol* 45:387-391.2001 .
- (305) Breneman D, Bronsky EA, Bruce S, Kalivas JT, Klein GL, Roth HL et al. : Cetirizine and astemizole therapy for chronic idiopathic urticaria: a double-blind, placebo-controlled, comparative trial. *J Am Acad Dermatol* 33:192-198.1995 .
- (306) Prussin C, Metcalfe DD : Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunological Methods* 188:117-128.1995 .
- (307) Antal-Szalmás P, Poppelier MJ, Sümegi A, van der Bruggen T, Verhoef J, van Kessel KP : Spare CD14 molecules on human monocytes enhance the sensitivity for low LPS concentrations. *Immunol Letters* 93:11-15.2004 .
- (308) Antal-Szalmás P, Szöllősi I, Lakos G, Kiss E, Csipő I, Sümegi A : A novel flow cytometric assay to quantify soluble CD14 concentration in human serum. *Cytometry* 45:115-123.2001 .
- (309) Bodolay E, Csipő I, Gál I, Sipka S, Gyimesi E, Szekanecz Z et al. : Anti-endothelial cell antibodies in mixed connective tissue disease: Frequency and association with clinical symptoms. *Clin Exp Rheumatol* 22:409-415.2004 .
- (310) Papp H, Czifra G, Bodó E, Lázár J, Kovács I, Aleksza M et al. : Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 61:1095-1105.2004 .
- (311) Lazar J, Szabo T, Kovacs L, Blumberg PM, Biro T : Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol Life Sci* 60(10):2228-2240.2003 .
- (312) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.1970 .
- (313) Chomczynski P : A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15:532-535.1993 .
- (314) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 161:156-159.1987 .
- (315) Semsei I, Ma S, Cutler RG : Tissue and age specific expression of the proto-oncogene myc family throughout the life span of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene* 4:465-471.1989 .
- (316) Chan EK, Hamel JC, Buyon JP, Tan EM : Molecular definition and sequence motifs of the 52 kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *J Clin Invest* 87:68-76.1991 .
- (317) Ben Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF : Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60 kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 83:1284-1292.1989 .
- (318) Schlaak JF, Buslau M, Jochum W, Hermann E, Girndt M, Gallati H et al. : T cell clones in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102(2):145-149.1994 .
- (319) Aarvak T, Chabaud M, Thoen J, Miossec P, Natvig JB : Changes in the Th1 or Th2 cytokine dominance in the synovium of rheumatoid arthritis (RA): a kinetic study of the Th subsets in one unusual RA patient. *Rheumatology* 39(5):513-522.2000 .
- (320) Nakazawa M, Sugi WL, Kawaguchi H, Ishii N, Nakajima H, Minami M : Predominance of type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *Clinics in Dermatol* 99(5):673-682.1997 .
- (321) Chang DM, Su WL, Chu SJ : The expression and significance of intracellular T helper cytokines in systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest* 31(1):1-12.2002 .
- (322) Walker C, Kagi MK, Ingold P, Braun P, Blaser K, Bruijnzeel-Koomen CA et al. : Atopic dermatitis: correlation of peripheral blood T cell activation, eosinophilia and serum factors with clinical severity. *Clin and Exp Allergy* 23(2):145-153.1993 .
- (323) Miadonna A, Tedeschi A, Leggieri E, Cottini M, Menni S, Frolidi M et al. : Characterization of T cell subsets in patients with atopic dermatitis using OKT monoclonal antibodies. *Ann Allergy* 54:321-324.1985 .
- (324) Braathen LR : T-cell subsets in patients with mild and severe atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* 114 (Suppl):133-136.1985 .
- (325) Katagiri K, Itami S, Hatano Y, Yamaguchi T, Takayasu S : Increased levels of IL-13 mRNA, but not IL-4 mRNA, are found in vivo in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol* 108:189-194.1997 .
- (326) Teraki Y, Hotta T, Shiohara T : Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 143:373-378.2000 .
- (327) McKenzie ANJ, Culpepper JA, Malefyt DW, Briere F, Punnonen J, Aversa G et al. Interleukin-13, a T-cell derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *USA*: 1993.

- (328) de Vries JE, Zurawski G: Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. *Int Arch Allergy Immunol* 106:175-179.1995 .
- (329) Malefyt DW, Abrams JS, Zurawski SM, Lecron JC, Mohan-Peterson S, Sanjawala B et al. : Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 cell clones and EBV-transformed B-cells. *Int Immunol* 7:1405-1416.1995 .
- (330) Jung T, Lack G, Schauer U, Überück W, Renz H, Gelfand EW et al. : Decreased frequency of interferon-T and interleukin-2-producing cells in patients with atopic diseases measured at the single cell level. *Clinics in Dermatol* 96:515-527.1995 .
- (331) Katagiri K, Itami S, Hatano Y, Takayasu S: Increased levels of IL-13 mRNA, but not IL-4 mRNA, are found in vivo in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol* 108:189-194.1997 .
- (332) Tang MLK, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ: Reduced interferon-T secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 344:983-985.1994 .
- (333) Tang M, Kemp A, Varigos G: IL-4 and interferon-gamma production in children with atopic disease. *Clin Exp Immunol* 92:120-124.1993 .
- (334) Wakkach A, Cottrez F, Groux H: Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine? *Eur Cytokine Netw* 11:153-160.2000 .
- (335) Lester MR, Hofer MF, Gately M: Down-regulation effects of IL-4 and IL-10 on the IFN-gamma response in atopic dermatitis. *J Immunol* 154:6174-6181.1995 .
- (336) Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, Wang B, Feliciani C, Tulli A et al. : The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin disease. *J Am Acad Dermatol* 50(5):676-677.2004 .
- (337) Spergel JM: Atopic march: link to upper airways. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5:17-21.2005 .
- (338) Carnerio R, Reefer A, Wilson B, Hammer J, Platts-Mills T, Custis N et al. : T cell epitope-specific defects in the immune response to cat allergen in patients with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 122:927-936.2004 .
- (339) Ahmad-Nejad P, Mrabet-Dahbi S, Breuer K, Klotz M, Werfwi T, Herz U et al. : The toll-like receptor 2R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *Clinics in Dermatol* 113(3):565-567.2004 .
- (340) Weidinger S, Novak N, Klopp N, Baurecht H, Wagenpfeil S, Rummeler L et al. : Lack of association between Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 polymorphism and atopic eczema. *Clinics in Dermatol* 118(1):277-279.2006 .
- (341) Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiemermann C, Hinds CJ: Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immunol* 73:7613-7619.2005 .
- (342) Wittebole X, Coyle SM, Kumar A, Goshima M, Lowry SF, Calvano SE: Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leukocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol* 141:99-106.2005 .
- (343) Tsujimoto H, Ono S, Majima T, Kawarabayashi N, Takayama E, Kinoshita M et al. : Neutrophil elastase, MIP-2, and TLR-4 expression during human and experimental sepsis. *Shock* 23:39-44.2005 .
- (344) Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M: Increased expression of Toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock* 22:403-409.2004 .
- (345) Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, Herrmann R, Ferrara P: Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* 23:2144-2151.1993 .
- (346) Zdzienicka HA, Jenmalm MC: Reduced levels of soluble CD14 in atopic children. *Clin Exp Allergy* 34:532-539.2004 .
- (347) Wüthrich B, Kagi MK, Joller-Jemelka H: Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 284:339-342.1992 .
- (348) Furue M, Koga T, Yamashita N: Soluble E-selectin and eosinophil cationic protein are distinct serum markers that differentially represent clinical features of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 140:67-72.1999 .
- (349) Gilhar A, David M, Ullmann Y, Betrussi T, Kalish RS: T-lymphocyte dependence of psoriatic pathology in human psoriatic skin grafted to SCID mice. *J Invest Dermatol* 109:283-288.1997 .
- (350) Yamamoto T, Matsuuchi M, Katagama I, Nishioka K: Repeated subcutaneous injection of *Saphylococcal* enterotoxin B-stimulated lymphocytes retain epidermal thickness of psoriatic skin-graft onto severe combined immunodeficient mice. *J Dermatol Sci* 17:8-14.1998 .
- (351) Boehncke WH, Dressel D, Zollner TM, Kaufman R: Pulling the trigger on psoriasis (letter). *Nature* 379:777.1996 .
- (352) Muller W, Herrmann B: Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 301:555.1979 .
- (353) Bachelez H, Flageul B, Dubertret L, Fraitag S, Grossman R, Brousse N et al. : Treatment of recalcitrant plaque psoriasis with a humanized non-depleting antibody to CD4. *J Autoimmun* 11:53-62.1998 .
- (354) Ellis CN, Krueger GG: treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 345:248-255.2001 .
- (355) Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Bilings JK, Brown MD, Headington JT et al. : Cyclosporin improves psoriasis in a double-blind study. *JAMA* 256(22):3110-3116.1986 .

- (356) Kragballe K, Beck HI, Sogaard H: Improvement of psoriasis by a topical vitamin D3 analogue (MC903) in a double-blind study. *Br J Dermatol* 199;223-230.1998.
- (357) Weinshter BG, Bass BH, Ebers GC, Rice GP : Reversion of psoriatic lesions with monoclonal-CD3 (Ortoclone OKT3) treatment. *J Am Acad Dermatol* 20:1132-1133.1989.
- (358) Prinz J, Braun-Falco O, Meurer M, Daddona P, Reiter C, Rieber P et al. : Chimeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet* 338:320-321.1991.
- (359) Jegasothy BV, Ackerman CD, Toda S, Fung JJ, Abu-Elmagd K, Starzl TE: Tacrolimus (FK506): a new therapeutic agent for severe recalcitrant psoriasis. *Arch Dermatol* 128:781-785.1992.
- (360) Vallat VP, Gilleaudeau P, Battat L, Wolfe J, Nabeya R, Hefler N et al. : PUVA bath therapy strongly suppresses immunological and epidermal activation in psoriasis: a possible cellular basis for remittive therapy. *J Exp Med* 180:283-296.1994.
- (361) Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB et al. : Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1:442-447.1995.
- (362) Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Hefler NS et al. : Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and selective depletion of intraepidermal T cells. *J Exp Med* 182:2057-2068.1995.
- (363) Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, Jones FG : Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *BMJ* 300:908.1990.
- (364) Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL : Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 126:1523.1990.
- (365) Wrone-Smith T, Nickoloff BJ : Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *J Clin Invest* 98:1878-1887.1996.
- (366) Nickoloff BJ, Wrone-Smith T : Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol* 155:145-158.1999.
- (367) Nickoloff BJ, Wrone ST : Superantigens, autoantigens and pathogenic T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol* 110:459-461.1998.
- (368) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR : Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 170:2081-2085.1989.
- (369) Zalewska A, Wyczółkowska J, Dziankowska-Bartowiak B, Sysa-Jedrzejowska A : Interleukin 4 plasma levels in psoriasis vulgaris patients. *Med Sci Monit* 10(4):CR156-CR162.2004.
- (370) Rotsztein H, Zalewska A, Trznadel-Budzko E, Lewkowicz P, Banasik M, Tchórzewski H et al. : Influence of systemic pathocemotherapy on regulatory T cells and selected cytokine production in psoriatic patients: a pilot study. *Med Sci Monit* 11(12):CR594-CR598.2005.
- (371) Teraki Y, Hotta T, Shiohara T : Increased circulating skinhoming cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 143:373.2000.
- (372) Chodorowska G : Plasma concentrations of IFN-gamma and TNF-alpha in psoriatic patients before and after local treatment with dithranol ointment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 10:147-151.1998.
- (373) Elkayam O, Yaron I, Shirazi I, Yaron M, Caspi D : Serum levels of IL-10, IL-6, IL-1ra, and sIL-2R in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 19:101-105.2000.
- (374) Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S : Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150:353-360.1993.
- (375) Wakkach A, Cottrez F, Groux H : Can interleukin-10 be used as a true immunoregulatory cytokine? *Eur Cytokine Netw* 11:153-160.2000.
- (376) Seifert M, Sterry W, Effenberger E, Rexin A, Friedrich M, Haeussler-Quade A et al. : The antipsoriatic activity of IL-10 is rather caused by effects on peripheral blood cells than by a direct effect on human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 292:164-172.2000.
- (377) Spach KM, Hayes CE : Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol* 175:4119-4126.2005.
- (378) Zhang AB, Zheng SS, Jia CK, Wang Y : Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on preventing allograft from acute rejection following rat orthotopic liver transplantation. *World J Gastroenterol* 9(5):1067-1071.2003.
- (379) Redaelli CA, Wagner M, Gunter-Duwe D, Tian YH, Stahel PF, Mazzucchelli L et al. : 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 shows strong and additive immunomodulatory effects with cyclosporine A in rat renal allotransplants. *Kidney Int* 61(1):288-296.2002.
- (380) Tsuji M, Fujii K, Nakamo T, Nishii Y : 1 alpha-hydroxyvitamin D3 inhibits type II collagen-induced arthritis in rats. *FEBS Lett* 337(3):248-250.1994.
- (381) Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF : 1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis. *J Nutr* 128(1):68-72.1998.
- (382) Yamauchi Y, Tsunematsu T, Konda S, Hoshito T, Itokawa Y, Hoshizaki H : A double blind trial of alfalcidol on patients with rheumatoid arthritis (RA). *Ryumachi* 29(1):11-24.1989.

- (383) Hein G, Oelsner P : Vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis: findings--hypotheses--consequences. *Z Rheumatol* 59(Suppl 1):28-32.2000 .
- (384) Bito T, Roy S, Sen CK, Packer L : Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN-gamma-induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Radic Biol Med* 28:219-227.2000 .
- (385) Raanani P, Ben Bassat I : Immune-mediated complications during interferon therapy in hematological patients. *Acta Haematol* 107:133-144.2002 .
- (386) Malet A, Engel P, Huguet J, Garcia-Calderon PA : Immunologic parameters in chronic urticaria. *Allergol Immunopathol Madr* 14(5):375-381.1986 .
- (387) Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP : Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* 129:254-260.2003 .
- (388) Wedi B, Novacovic V, Koerner M, Kapp A : Chronic urticaria serum induces histamine release, leukotriene production, and basophil CD63 surface expression - Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs. *Clinics in Dermatol* 105:552-560.2000 .
- (389) Reilly KM, Yap PL, Dawes J, Barneston J, MacKenzie F, Allan TL : Circulating basophil counts in atopic individuals. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 84:424-426.1987 .
- (390) MacGlashan DW, Jr., McKenzie-White J, Chichester K : In vitro regulation of FcεRI expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* 91:1633-1643.1998 .
- (391) Lie WJ, Knol EF, Mul FP, Jansen HM, Roos D, van der Zee JS : Basophils from patients with allergic asthma show a primed phenotype. *Clinics in Dermatol* 104:1000-1007.1999 .
- (392) De Swertdt A, Van Den KC, Kasran A, Cadot P, Neyens K, Coorevits L et al. : Detection of basophil-activating IgG autoantibodies in chronic idiopathic urticaria by induction of CD6. *Clinics in Dermatol* 116:662-667.2005 .
- (393) Erdmann SM, Sachs B, Kwiecien R : The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy* 59:1102-1109.2004 .
- (394) Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I, Uasuf C, Vila L, Garcia-Aviles C et al. : Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp All* 32:277-286.2002 .
- (395) Saporta M, Kamei S, Persi L, Bousquet J, Arnoux B : Basophil activation during pollen season in patients monosensitized to grasspollens. *Allergy* 56:442-445.2001 .
- (396) Sainte-Laudy J, Sabbah A, Drouet M, Lauret MG, Loiry M : Diagnosis of venom allergy by flow cytometry. Correlation with clinical history, skin test, specific IgE, histamine and leukotriene C4 release. *Clin Exp Allergy* 30:1166-1171.2000 .
- (397) Bochner BS : Systemic activation of basophils and eosinophils: Markers and consequences. *Clinics in Dermatol* 106:S292-S302.2000 .
- (398) Husz S : Az urticaria patogenezeise, klinikai formái és kezelése. *Med Anon* 5:37-41.2002 .
- (399) Yasnowsky KM, Dreskin SC, Efaw B, Schoen D, Vedanthan PK, Alam R et al. : Chronic urticaria sera increased basophil CD203c expression. *Clinics in Dermatol* 117:1430-1434.2006 .
- (400) Ebo DG, Sainte-Laudy J, Bridts CH, Mertens CH, Hagendorens MM, Schuerwegh AJ et al. : Flow-assisted allergy diagnosis: current applications and future perspectives. *Allergy* 61:1028-1039.2006 .
- (401) Greaves MW : Chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 105:664-672.2000 .
- (402) Hide M, Francis DM, Grattan CEH, Barr RM, Winkelmann RK, Greaves MW : The pathogenesis of chronic idiopathic urticaria: new evidence suggests an auto-immune basis and implications for treatment. *Clin Exp Allergy* 24:624-627.1992 .
- (403) Nettis E, Dambra P, D'Oronzio L, Cavallo E, Loria MP, Fanelli M et al. : Reactivity to autologous serum skintest and clinical features in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Dermatol* 27:29-31.2002 .
- (404) Grattan CEH, D'Cruz DP, Francis DM, Whiston C, Hughes GRV, Greaves MW : Antiendothelial cell antibodies in chronic urticaria. *Clin Exp Rheumatol* 13(2):272-273.1995 .
- (405) O'Donnell BF, Francis DM, Swana GT, Seed PT, Kobza BA, Greaves MW : Thyroid autoimmunity in chronic urticaria. *Br J Dermatol* 153(2):331-335.2005 .
- (406) Humphreys F, Hunter JAA : The characteristics of urticaria in 390 patients. *Br J Dermatol* 138:635-638.1998 .
- (407) Caproni M, Volpi W, Giomi B, Cardinali C, Antiga E, Melani L et al. : Chronic idiopathic and chronic autoimmune urticaria: clinical and immunopathological features of 68 subjects. *Acta Derm Venerol* 84(4):288-290.2004 .
- (408) Grattan CEH : Autoimmune urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am* 24:163-181.2004 .
- (409) Sheikh J : Advances in treatment of chronic urticaria. *Immunol Allergy Clin N Am* 24:317-334.2004 .
- (410) Handa S, Dogra S, Kumar B : Comparative efficacy of cetirizine and fexofenatidine in the treatment of chronic idiopathic urticaria. *J Dermatol Treat* 15(1):55-57.2004 .
- (411) Harvey RP, Wegs J, Schocket AL : A controlled trial of therapy in chronic urticaria. *Clinics in Dermatol* 68(4):262-266.1981 .
- (412) Kaplan AP : Chronic urticaria and angioedema. *N England J Med* 346:175-179.2002 .
- (413) Barlow RJ, Kobza BA, Greaves MW : Treatment of severe, chronic urticaria with cyclosporin A. *Eur J Dermatol* 3:273-275.1993 .

- (414) Papp H, Czifra G, Lázár J, Boczán J, Gönczi M, Csernoch L et al. : Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation of HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 12:811-824.2003 .
- (415) Alessi DR : The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1T and p70 S6 kinase. *FEBS Letters* 402:121-123.1997 .
- (416) Gschwendt M, Müller H-J, Kialbassa K, Zang R, Kittstein W, Rincke G : Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 199:93-98.1994 .
- (417) Lenox JM, Koch PJ, Mahoney MG, Lieberman M, Stanley JR, Radice GL : Postnatal lethality of P-cadherin/desmoglein 3 double knockout mice: demonstration of a cooperative effect of these cell adhesion molecules in tissue homeostasis of stratified squamous epithelia. *J Invest Dermatol* 114:948-952.2000 .
- (418) Hakuno M, Akiyama M, Shimizu H, Wheelock MJ, Nishikawa T : Upregulation of P-cadherin expression in the lesional skin of pemphigus, Hailey-Hailey disease and Darier's disease. *J Cutan Pathol* 28:277-281.2001 .
- (419) Fujita M, Furukawa F, Fujii K, Horiguchi Y, Takeichi M, Imamura S : Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development? Morphogenesis of epidermis, hair follicles and eccrine sweat duct. *Arch Dermatol Res* 284:159-166.1992 .
- (420) Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S : Mutations in ATP2C1, encoding a Ca²⁺ pump, cause Darier disease. *Nat Genet* 21:271-277.1999 .
- (421) Hennings H, Holbrook KA : Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res* 143(1):127-142.1983 .
- (422) Pasdar M, Nelson WJ : Regulation of desmosome assembly in epithelial cells: kinetics of synthesis, transport, and stabilization of desmoglein I, a major protein of the membrane core domain. *J Cell Biol* 109(1):163-177.1989 .
- (423) Demlehner MP, Schafer S, Grund C, Franke WW : Continual assembly of half-desmosomal structures in the absence of cell contacts and their frustrated endocytosis: a coordinated Sisyphus cycle. *J Cell Biol* 131(3):745-760.1995 .
- (424) Burdet ID : Aspects of the structure and assembly of desmosomes. *Micron* 29(4):309-328.1998 .
- (425) Sontheimer RD, McCauliffe DP : Pathogenesis of anti-Ro/SS-A autoantibody-associated cutaneous lupus erythematosus. *Dermatol Clin* 8:751-758.1990 .
- (426) McCauliffe DP, Lux FA, Lieu TS, Sanz I, Hanke J, Newkirk MM et al. : Ro/SS-A and the pathogenic significance of its antibodies. *J Autoimmun* 2:375-381.1989 .
- (427) Lee LA, Weston WL : New findings in neonatal lupus syndrome. *Am J Dis Child* 138:233-236.1984 .
- (428) Lee LA, Gaither KK, Coulter SN, Norris DA, Harley JE : Pattern of cutaneous immunoglobulin G deposition in subacute cutaneous lupus erythematosus is reproduced by infusing purified anti-Ro(SSA) antibodies into human skin-grafted mice. *J Clin Invest* 83:1556-1562.1989 .
- (429) Sontheimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, Gilliam JN : Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 97:664-671.1982 .
- (430) Furukawa F, Lyons MB, Lee LA, Coulter SN, Norris DA : Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. *J Immunol* 141:1480-1488.1988 .
- (431) Sontheimer RD : Subacute cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 3:58-68.1985 .
- (432) Lee LA, David, KM : Cutaneous lupus erythematosus. *Curr Probl Dermatol* 1:161-200.1989 .
- (433) Jones SK : Ultraviolet radiation (UVR) induced cell-surface Ro/SS-A antigen expression by human keratinocytes in vitro: a possible mechanism for the UVR induction of cutaneous lupus lesions. *B J Dermatol* 126:546-553.1992 .
- (434) Buyon JP : Neonatal lupus and autoantibodies reactive with SSA/Ro-SSB/La. *Scand J Rheumatol* 107:23-30.1998 .
- (435) Rose E, Pillsbury DM : Lupus erythematosus and ovarian function: relationship with a report of 6 cases. *Ann Intern Med* 21:1022.1944 .
- (436) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig : Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-771.1988 .
- (437) Kawashima T, Zappi EG, Lieu TS, Sontheimer RD : Impact of ultraviolet radiation on expression of Ro/SS-A-autoantigenic polypeptides in transformed human epidermal keratinocytes. *Lupus* 3(6):493-500.1994 .
- (438) Inman RD : Immunologic sex difference and the female predominance in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 21:849-852.1978 .
- (439) Dubois EL. The clinical picture of systemic lupus erythematosus. Los Angeles: University of Southern California Press, 1974.
- (440) Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J : Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 22:1195-1198.1979 .
- (441) Theofilopoulos AN, Dixon FJ : Etiopathogenesis of murine SLE. *Transplant Rev* 55:179-183.1981 .
- (442) Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam JN : Subacute cutaneous lupus erythematosus. A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch Dermatol* 115:1409-1412.1979 .
- (443) Watson RM, Lane AT, Barnet NK, Bais WB, Arnett FC, Provost TT : Neonatal lupus erythematosus. A clinical serological and immunogenetic study with review of the literature. *Medicine* 63:362-378.1984 .
- (444) Wang D, Chan EKL : 17 β -estradiol increases expression of 52-kD and 60 kD SS-A/Ro autoantigens in human keratinocytes and breast cancer cell line MCF-. *J Invest Dermatol* 107:610-614.1996 .

- (445) Mossmann TR, Cherwinski H, Bone MW, Giedlin MA, Coffman RL : Two type of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357.1986 .
- (446) Seder RA, Mosmann TR : Differentiation of effector phenotypes of CD4+ and CD8+ T cells. *Fundamental Immunology*:879-908.1998 .
- (447) Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Yamaoka K, Ogami E, Nagano S et al. : Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42:1644-1648.1999 .
- (448) Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DV, Lawson BR : The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1?Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 3:136-141.2001 .
- (449) Tokano Y, Morimoto S, Kaneko H, Amano H, Nozawa K, Takasaki Y et al. : Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)-relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin Exp Immunol* 116:169-173.1999 .
- (450) Kono DH, Balomenos D, Park MS, Theofilopoulos AN : Development of lupus in BXSb mice is independent of IL-4. *J Immunol* 164:38-42.2000 .
- (451) Kochevar IE : Action spectrum and mechanism of UV radiation induced injury in lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 85:140s-143s.1985 .
- (452) Sutherland BM, Hacham H, Gange RW, Sutherland JC. Pyrimidine dimer formation by UVA radiation: implication for photoreactivation
Biologic responses to UVA irradiation. Kansas City: Valdenmar, 1991.
- (453) Krutmann J, Czech W, Diepgen T, Niedner R, Kapp A, Schopf E : High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 26:225-230.1992 .
- (454) Skov L, Hansen H, Allen M, Willadsen L, Noval M, Barker JN et al. : Contrasting effects of ultraviolet A1 and ultraviolet B exposure on the induction of tumor necrosis factor-alpha in human skin. *Br J Dermatol* 138:216-220.1998 .
- (455) Reeve VE, Bosnic M, Boehm-Wilcox C, Nishimura N, Ley RD : Ultraviolet A radiation (320-400 nm) protects hairless mice from immunosuppression induced by ultraviolet B radiation (280-320 nm) or cis-urocanic acid. *Int Arch Allergy Immunol* 115:326-22.1998 .
- (456) Pavel S : Light therapy (with UVA-1) for SLE patients: is it a good or bad idea? *Rheumatology* 45:653-655.2006 .